

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL**

**CARACTÉRISATION DE L'AXE MT1-MMP/COX-2 DANS LES CELLULES  
SOUCHES CANCÉREUSES CD133(+) DE GLIOBLASTOME**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE**

**PAR  
CARL LAFLAMME**

**AOÛT 2009**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Le goût de poursuivre des études au-delà du second cycle est d'abord influencé par la qualité des connaissances acquises lors de la Maîtrise mais aussi par le plaisir éprouvé lors du travail en laboratoire. En effet, au cours de mes deux années à l'UQAM, j'ai eu de formidables mentors qui ont su me léguer une solide formation en biochimie ainsi qu'une pensée critique développée. J'ai aussi fait la rencontre de personnes extraordinaires tout au long de ma maîtrise qui ont su agrémenter mon travail de recherche... du complexe sportif au Bénélux en passant par la salle de culture!

J'aimerais avant tout remercier le Dr Borhane Annabi. Borhane a été un excellent mentor. Il m'aura supporté, guidé et aidé dans tous les aspects propres à des études de second cycle. Borhane a eu une grande influence sur moi tant au niveau de la pensée scientifique que du plaisir propre à la recherche.

Mes remerciements vont aussi au Dr Richard Béliveau. Sa passion pour la recherche et son dévouement pour le bien de la société me serviront d'exemple à suivre lors de ma carrière qui ne fait que débiter.

J'aimerais remercier particulièrement Marie-Paule qui m'a enseigné les techniques de biochimie et qui a continué à m'assister tout au long de mes deux années. Cette maîtrise aurait été bien différente sans mes autres collègues de laboratoire. Merci Simon, Jean-Christophe, Karine, Asmaa et Alex.

Enfin, je tiens à souligner la contribution de la Fondation UQAM pour son soutien financier en m'octroyant différentes bourses lors de cette maîtrise.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vi
RÉSUMÉ .....	viii
CHAPITRE I .....	1
INTRODUCTION .....	1
1. Le cancer .....	1
1.1. Statistiques .....	1
1.1.1. Cancers cérébraux – Définition et traitements disponibles .....	1
1.2. Les grandes signatures des processus cancéreux.....	2
1.3. Identification de cellules souches cancéreuses.....	4
1.3.1. Les modèles d’initiation tumorale.....	4
1.3.2. La définition d’une cellule souche cancéreuse.....	5
1.3.3. Cibler les CSC .....	5
1.3.4. CD133, un des marqueurs des cellules souches cancéreuses .....	6
1.3.5. L’expression de CD133 influence le pronostic clinique des patients atteints de gliomes 7	
1.3.6. Structure et fonction de la protéine CD133 .....	8
1.3.7. Mode de culture des cellules souches cancéreuses CD133(+).....	8
1.3.8. Essai néoplasique <i>in vivo</i> .....	9
1.4. Voies de signalisation tumorale .....	9
1.4.1. Inflammation et cancer .....	10
1.4.2. La voie de signalisation NF-κB : le pont entre l’inflammation et le cancer .....	10
1.5. Phénotype invasif des cancers cérébraux .....	14
1.5.1. Matrice extracellulaire .....	15
1.5.2. Structure des métalloprotéinases matricielles.....	15
1.5.3. Rôles et régulation de la MT1-MMP.....	16
1.6. Concept de niche vasculaire .....	18
CHAPITRE II.....	30
PRÉSENTATION DU PROJET .....	30

Objectif 2 : Étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de COX-2 via MT1-MMP dans les CSC CD133(+)	31
CHAPITRE III	32
ARTICLE	32
Abstract	35
Background	36
Methods	38
Results	42
Discussion	46
List of abbreviations	49
References	52
CHAPITRE IV	62
DISCUSSION	62
CONCLUSION	74
LISTE DES RÉFÉRENCES	75

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Récurrence locale des glioblastomes .....	20
Figure 2 : Signatures du cancer .....	21
Figure 3 : Deux modèles généraux de développement tumoral .....	22
Figure 4 : Cibler les cellules souches cancéreuses pour de meilleurs pronostics en clinique .....	23
Figure 5 : Topologie membranaire prédite de CD133 .....	24
Figure 6 : Deux techniques d'enrichissement de cellules CD133(+) .....	25
Figure 7 : Mécanismes moléculaires menant à l'activation de NF- $\kappa$ B .....	26
Figure 8 : Rôles et phénotypes associés à NF- $\kappa$ B, COX-2, MT1-MMP et CD133 dans les cancers .....	27
Figure 9 : Dégradation de la MEC et promotion de la croissance tumorale par les MMPs .....	28
Figure 10 : Structure générale des MMPs et illustration de leur site catalytique .....	29
Figure 11 : Axe MT1-MMP/COX-2 tel que proposé selon nos recherches .....	71
Figure 12 : Schématisation du rôle de la niche vasculaire et de son ciblage .....	72
Figure 13 : Ciblage des CSC CD133(+) à l'aide de composés phytochimiques .....	73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	«adenosine triphosphate-binding cassette»
BCRP	«breast cancer resistance protein»
CD133	Prominin-1 ou PROM1
c-IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose
COX	Cyclooxygénase
CSC	Cellules souches cancéreuses
DMBA	diméthyle-benz(a)anthracène
EGC	Épigallocatechine
EGCg	Épigallocatechine gallate
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermal
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
GBM	Glioblastome multiforme
HIF	Facteur inductible hypoxique
IKK	IKB Kinase
LIF	Facteur inhibiteur de leucémie
MEC	Matrice extracellulaire
MEF	Cellules de fibroblaste d'embryon de souris
MMP	Métalloprotéinase matricielle

MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle transmembranaire
NF- $\kappa$ B	Facteur nucléaire-kappa B
NSAID	Drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes
NSF	Facteur de survie neuronale
TIMP	Inhibiteurs tissulaires des MMPs
TRAF	Récepteur au TNF
TNF	Facteur tumoral nécrotique
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire



## RÉSUMÉ

Récemment, des spécialistes en cancérologie ont identifié au sein des tumeurs une sous-population cellulaire réfractaire aux traitements de chimio et de radiothérapie. Les caractéristiques cellulaires propres à cette population avoisinent celles des cellules souches. Il semblerait qu'aussi peu que 100 de ces cellules souches retrouvées dans les tumeurs soient capables de réinitier un cancer *in vivo*. Plusieurs arguments supportent un modèle de cellules souches cancéreuses (CSC) responsable de l'initiation tumorale. Dans les cancers cérébraux, ces CSC expriment le marqueur membranaire de cellules souches neuronales CD133. Les traitements ciblant les tumeurs cérébrales demeurent peu efficaces en partie à cause de la résistance des CSC CD133(+) face à ces traitements. Le ciblage de ces CSC serait donc porteur d'espoir. Le marqueur CD133 permet l'isolation et l'enrichissement de la population de CSC retrouvée au sein des lignées cellulaires ou des tumeurs primaires cérébrales. À l'aide du marqueur CD133, les caractéristiques propres aux CSC peuvent être mieux définies permettant un traitement ciblé. Les tumeurs cérébrales ayant des niveaux d'expression élevés de CD133 sont hautement malignes et un des joueurs clés de l'invasion tissulaire est la métalloprotéinase membranaire de type 1 (MT1-MMP). La protéine MT1-MMP est une protéase capable de dégrader la matrice extracellulaire et d'activer d'autres protéases. Une autre protéine qui est surexprimée dans les gliomes hautement malins est la cyclooxygénase de type 2 (COX-2). L'enzyme COX-2 joue des rôles clés dans la biosynthèse de prostaglandines impliquées entre autres dans des conditions pathologiques en encourageant l'inflammation, la sudation, la douleur et la fièvre. Cependant, une activité constitutive de COX-2 est associée au maintien de la prolifération cellulaire et à la résistance à l'apoptose dans les tumeurs.

Nous avons étudié l'expression des protéines MT1-MMP et COX-2 dans les CSC CD133(+) issues de tumeurs cérébrales. Les résultats obtenus montrent que les protéines COX-2 et MT1-MMP sont surexprimées dans les cellules CD133(+) enrichies d'une lignée cellulaire de tumeur cérébrale. La surexpression de ces deux protéines semble être régulée par un axe MT1-MMP/COX-2 dans les CSC CD133(+). En effet, MT1-MMP induit la surexpression de COX-2 dans les CSC CD133(+). Ce rôle de MT1-MMP dans les cascades signalétiques cellulaires nécessite une signalisation initiée via son domaine cytoplasmique. Nous avons aussi étudié la voie de signalisation qui régule l'axe MT1-MMP/COX-2 et avons découvert un rôle critique pour les facteurs de transcription de la famille de NF- $\kappa$ B. Ce nouvel axe pourrait être exploité dans l'optique d'une thérapie anti-cancer afin de diminuer le potentiel invasif des CSC CD133(+) et leur résistance aux traitements actuels.

Mots clés :

Cellules souches cancéreuses, CD133, COX-2, MT1-MMP, Glioblastome

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

### **1. Le cancer**

#### **1.1. Statistiques**

Le cancer est la deuxième cause mondiale de décès après les maladies cardiovasculaires. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer tuera 7,6 millions de personnes en 2005 et, d'ici 2015, ce nombre pourrait augmenter à près de 9 millions puis à 11,5 millions en 2030. Plus près de nous, le cancer progresse aussi rapidement. Selon les statistiques canadiennes et québécoises sur le cancer, la principale cause de décès au Québec depuis 2005 et la première cause de décès prématuré au Canada est le cancer (Statistics Canada, 2008). Au Québec, toutes les 13 minutes, une personne apprend qu'elle a un cancer (Société canadienne du cancer, 2008). Ces statistiques sont impressionnantes car le cancer progresse avec l'augmentation et le vieillissement de la population. Les connaissances sur les différents types de cancer ainsi que le développement de nouveaux traitements plus spécifiques progressent, mais la solution à l'enrayement de ce fléau reste encore bien hypothétique et les scientifiques devront encore faire preuve d'ingéniosité et de créativité pour trouver le talon d'Achille de cette maladie.

##### **1.1.1. Cancers cérébraux – Définition et traitements disponibles**

Les cancers cérébraux figurent parmi les cancers les plus agressifs et les plus meurtriers. Les glioblastomes multiformes représentent la classe de tumeur primaire cérébrale la plus commune chez l'adulte et dont le pronostic est le plus sombre (Radhakrishnan et al., 1995). Selon les statistiques canadiennes sur le cancer, sur les 2,600 cas de cancers cérébraux diagnostiqués en 2008 au Canada, 1,750 en mourront (Statistics Canada, 2008).

Les cancers cérébraux d'origine gliale se divisent en deux catégories principales selon l'origine des cellules cancéreuses, soient les astrocytes ou les oligodendrocytes (Kleihues et Sobin, 2000). Les gliomes se distinguent en différents grades selon la pathologie associée à la tumeur. Les glioblastomes multiformes (GBM) font parties des gliomes astrocytaires de haut

grade et ont une incidence aux États-Unis de 3 sur 100,000. Au moins 80% des gliomes malins sont des GBM (Radhakrishnan et al., 1995).

Les traitements pour les GBM consistent en trois étapes. Il y a d'abord une résection totale (si possible) de la masse cancéreuse (Simpson et al., 1993; Hess, 1999). La chirurgie est suivie d'un traitement de radiothérapie, le traitement principal depuis plusieurs décennies, qui prolonge significativement la survie totale des patients (Walker et al., 1978). Enfin, les patients se font administrer, en concomitance avec la radiothérapie, un traitement de chimiothérapie de plus en plus fréquemment depuis qu'il a été démontré que l'agent de chimiothérapie «temozolomide» améliore significativement la survie des patients atteints de GBM (Stupp et al., 2005; Taphoorn et al., 2005).

Bien que les traitements se soient améliorés au cours des dernières années, les GBM sont hautement létaux. La survie médiane des patients atteints de GBM ayant reçu les meilleurs traitements disponibles est de 12 à 15 mois (Scott et al., 1998). Les mauvais pronostics des patients atteints de GBM viennent de la capacité qu'ont ces tumeurs à infiltrer et envahir les tissus environnants sains du cerveau. Après les différents traitements, la récurrence des GBM survient dans la majorité des cas près du lieu de résection et celle-ci est responsable de la mortalité associée à cette maladie (Nakada et al., 2007) (Figure 1).

## 1.2. Les grandes signatures des processus cancéreux

Des évidences indiquent que la progression tumorale chez l'homme est un processus à multiétapes. Par exemple, l'établissement de lignées cellulaires cancéreuses à partir de cellules primaires (prélevées directement d'un organisme) afin de les maintenir longtemps en culture requiert plusieurs modifications génétiques (Hahn et al., 1999). Ces mutations accumulées donnent un avantage sélectif sur les cellules voisines. Pour devenir cancéreuses, les cellules saines acquièrent différentes propriétés lors de leur évolution au stade malin qui peuvent être résumées en six grandes signatures (Hanahan et Weinberg, 2000) (Figure 2).

D'abord, **1) les cellules cancéreuses acquièrent une autonomie en facteurs de croissance** réduisant leur dépendance au microenvironnement tissulaire normal. Les cellules normales ont besoin de signaux de croissance pour quitter leur état quiescent et entrer dans un

état actif de prolifération. Plusieurs oncogènes (gènes mutés dans les cellules normales menant à leur transformation en cellules cancéreuses) peuvent mimer les voies normales de croissance cellulaire d'une façon ou d'une autre. Les cellules cancéreuses génèrent donc plusieurs de leurs propres signaux de croissance résultant en une stimulation autocrine (Hanahan et Weinberg, 2000). Dans un même ordre d'idée, **II) les cellules cancéreuses développent une insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance**. Au sein d'un tissu normal, plusieurs signaux antiprolifératifs agissent en synergie pour maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Les mutations acquises au sein du génome des cellules cancéreuses déstabilisent la machinerie cellulaire régulant ces signaux d'arrêt de croissance dirigeant l'équilibre quiescence/prolifération vers la prolifération tumorale (Moses, Yang et Pietenpol, 1990; Weinberg, 1995). Cet équilibre est aussi influencé par les mécanismes d'apoptose, soit le processus par lequel une cellule déclenche sa propre mort en réponse à différents stimuli (Vaux, Cory et Adams, 1988; Strasser et al., 1990). **III) Les cellules cancéreuses développent une résistance à l'apoptose**. En effet, certaines mutations dans leur génome inhibent la production de protéines pro-apoptotiques et stimulent la production de protéines pro-survies balançant l'équilibre vers une prolifération accrue.

Les trois premières signatures ne sont pas suffisantes pour développer une tumeur. Des observations sur les cellules en culture ont indiqué qu'elles ne peuvent pas se propager indéfiniment (Hayflick, 1997). Les cellules cancéreuses doivent, pour se développer indéfiniment, **IV) acquérir un potentiel de réplication sans limites**. Pour ce faire, les cellules cancéreuses activent de façon constitutive la télomérase, soit l'enzyme responsable du maintien des télomères. Les télomères se situent à l'extrémité des chromosomes (Bryan et Cech, 1999) et ont pour rôle de les protéger. Leur dégradation limite la réplication cellulaire (Shay et Bacchetti, 1997). Les cellules souches sont naturellement immortelles puisqu'elles expriment la télomérase contrairement aux cellules différenciées. Ensuite, afin de maintenir l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires aux fonctions et la survie des cellules cancéreuses lors de la croissance tumorale, ces cellules créent de nouveaux vaisseaux sanguins, processus appelé **V) angiogenèse** (Bouck, Stellmach et Hsu, 1996; Folkman, 1997). Les cellules cancéreuses activent l'angiogenèse tumorale en favorisant l'expression de gènes pro-angiogéniques tels que le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et le FGF (facteur de croissance des fibroblastes) et la surexpression de leurs

récepteurs associés (Singh et al., 1995; Volpert, Dameron et Bouck, 1997). Enfin, certaines cellules cancéreuses réussissent à se séparer de la masse tumorale initiale afin **VI) d'envahir les tissus environnants** et créer une **métastase** à un autre endroit du corps où, au moins initialement, les nutriments et l'espace ne sont pas limitants. Les métastases sont la cause de 90% des morts par le cancer (Sporn, 1996). Un paramètre important des capacités à envahir les tissus et initier les métastases implique l'utilisation de protéases pour dégrader la matrice extracellulaire qui limite les déplacements cellulaires (Coussens et Werb, 1996). Parmi ces protéases figure la grande famille des métalloprotéinases matricielles surexprimées dans la majorité des cancers malins (Chambers et Matrisian, 1997).

### **1.3. Identification de cellules souches cancéreuses**

#### **1.3.1. Les modèles d'initiation tumorale**

Un problème fondamental en recherche sur le cancer est l'identification des types cellulaires pouvant soutenir la croissance tumorale. Depuis plus de 100 ans, les cancers humains sont définis comme une population de cellules morphologiquement hétérogènes. Cependant, la morphologie et la fonction des cellules sont difficiles à relier et peu est connu sur les propriétés des cellules qui initient et maintiennent les cancers. L'idée qu'une sous-population cellulaire soit responsable du maintien des tumeurs a émergé il y a environ 50 ans (Brunschwig, 1960). Deux modèles de cellules initiatrices de cancer se confrontent dans la littérature (Figure 3).

##### *Modèle stochastique*

Le modèle stochastique assume que chaque cellule cancéreuse possède la capacité de proliférer indéfiniment et de régénérer une tumeur. Ce modèle prédit que la tumeur est relativement homogène et que les mécanismes néoplasiques menant vers l'état malin sont fonctionnels dans chacune des cellules cancéreuses. Donc, tous les rôles associés au développement, à la progression et à l'invasion tumorale sont régis par toutes les cellules cancéreuses, sans distinction (Ward et Dirks, 2007).

### *Modèle des cellules souches cancéreuses*

Le modèle des cellules souches cancéreuses (CSC), pour sa part, stipule qu'une sous-population cellulaire au sein des tumeurs a la capacité d'initier et de maintenir la croissance tumorale. Ce postulat implique une hétérogénéité fonctionnelle existante parmi les cellules qui sont présentes dans la masse cancéreuse. La division d'une tumeur en plusieurs sous-populations différentes suppose qu'il est possible de purifier et d'isoler les cellules responsables de l'initiation d'un cancer. Le développement de modèles *in vivo* permettant de questionner le potentiel initiateur des différentes sous-populations a permis l'identification de CSC au sein de cancers humains du cerveau, du sein, de la peau, des os, de la prostate et du sang (Dick, 2003). Plusieurs recherches à ce jour misent sur le ciblage des CSC dans le but de développer une thérapie contre les tumeurs cérébrales.

#### **1.3.2. La définition d'une cellule souche cancéreuse**

Les CSC se définissent en trois points (Ward et Dirks, 2007) :

- I. Les CSC devraient pouvoir régénérer la tumeur dont elles proviennent lorsqu'injectées en nombre limité dans le même microenvironnement tissulaire *in vivo* (orthotopique).
- II. Les CSC devraient pouvoir s'auto-renouveler *in vivo*.
- III. Les CSC devraient démontrer une capacité de différenciation reproduisant la tumeur initiale. La tumeur générée *in vivo* devrait représenter une phénocopie de la tumeur originale.

#### **1.3.3. Cibler les CSC**

Comme les cellules souches normales, les CSC ont la capacité de s'auto-renouveler et de donner naissance à une variété de cellules prolifératives et différenciées. Les CSC sont relativement quiescentes et pourraient ne pas être affectées par des thérapies ciblant les cellules à divisions rapides. Une expression élevée de transporteurs qui pompent hors de la cellule les agents de chimiothérapie (Hirschmann-Jax et al., 2004) et une capacité accrue de

réparation de l'ADN endommagé après un traitement de radiothérapie contribuent aussi à l'habilité des CSC à survivre aux modes conventionnels de thérapie (Bao et al., 2006).

Les thérapies existantes contre les gliomes ciblent la population tumorale générale. Puisque la majorité des cellules cancéreuses ont un potentiel prolifératif limité, l'habilité de diminuer la taille générale de la masse cancéreuse reflétait une habilité à cibler les cancers. Cependant, les récurrences des cancers sont fréquentes après les différents traitements de chimio et de radiothérapie. Des traitements efficaces contre le cancer devraient idéalement cibler les CSC. En assumant que les CSC ne représentent qu'une petite proportion de la tumeur entière, les cibler risque, à court terme, d'avoir peu d'impact sur la taille globale de la tumeur. Cependant, avec le temps, la tumeur devrait perdre sa capacité de prendre de l'expansion et se résorber (voir Figure 4). Pour cibler les CSC, des marqueurs qui leur sont spécifiques doivent être définis ainsi que leurs caractéristiques biochimiques propres.

#### **1.3.4. CD133, un des marqueurs des cellules souches cancéreuses**

En 2003, le groupe du Dr P.B. Dirks a réussi à isoler d'une tumeur cérébrale une population cellulaire ayant des propriétés de cellules souches et exprimant le marqueur de cellules souches neuronales CD133 (Singh et al., 2003). Par la suite, ce même groupe a observé que seule la fraction CD133(+) retrouvée au sein des tumeurs cérébrales de type glioblastome avait la capacité de réinitier le développement tumoral lors d'injections orthotopiques chez des souris (Singh et al., 2004). En effet, une injection d'aussi peu que 100 cellules CD133(+) isolées d'un glioblastome humain peut produire une tumeur *in vivo*, alors que l'injection de 100,000 cellules CD133(-) ne développe pas de tumeur (Singh et al., 2004). Ces différents résultats supportent le modèle des CSC. Le ciblage spécifique des CSC ouvre ainsi la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques envers les cancers cérébraux.

### 1.3.5. L'expression de CD133 influence le pronostic clinique des patients atteints de gliomes

Différentes études montrent une corrélation entre le pourcentage de cellules CD133(+) retrouvées au sein d'une tumeur et la survie générale des patients atteints de cancer du cerveau (Liu et al., 2006; Vescovi, Galli et Reynolds, 2006). En ce sens, une population de plus de 1% de cellules CD133(+) au sein de gliomes, en comparaison avec une population de moins de 1%, augmente significativement le taux de récurrence après un premier traitement, augmente la probabilité d'une progression maligne en plus de diminuer substantiellement le temps de vie des patients (Zeppernick et al., 2008). Ces études montrent aussi une corrélation dans les gliomes entre l'augmentation du nombre total de cellules CD133(+) et la progression tumorale vers un grade plus malin. D'ailleurs, le pourcentage de cellules CD133(+) augmente à près de 25% dans les tumeurs de glioblastomes hautement malignes (Zeppernick et al., 2008).

Les glioblastomes ont un très mauvais pronostic clinique dû, en partie, à une résistance accrue à la radiothérapie et à divers traitements. Il a été démontré que les CSC CD133(+) contribuent à la radiorésistance des glioblastomes par une activation préférentielle de leurs mécanismes de réparation de l'ADN (Bao et al., 2006). De plus, les cellules CD133(+) augmentent en nombre après l'irradiation de cellules de glioblastome en culture et dans des tumeurs *in vivo*. Ces résultats indiquent que les CSC CD133(+) ont une résistance intrinsèque à la radiation comparativement à la population générale tumorale (Bao et al., 2006). Dans un même ordre d'idée, une population cellulaire CD133(+) enrichie d'une lignée de médulloblastome (cancer cérébral pédiatrique) est davantage radiorésistante qu'une population de cellules CD133(-) (Blazek, Foutch et Maki, 2007). Aussi, les cellules CD133(+) de tumeurs cérébrales sont résistantes à des agents chimiothérapeutiques tels que le temozolomide, carboplatin, l'étoposide et le paclitaxel comparativement aux cellules CD133(-) (Liu et al., 2006). Un des mécanismes importants dans la résistance aux drogues est l'expression de protéines de la famille des «adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) super family». Les membres de la superfamille des ABC sont des pompes dépendantes de l'ATP. Ces transporteurs membranaires peuvent jeter hors de la cellule les molécules de chimiothérapie. Les CSC CD133(+) expriment fortement l'un des membres de cette famille,



soient la «breast cancer resistance protein-1» (BCRP-1) qui semble en partie responsable de leur résistance intrinsèque aux agents de chimiothérapie (Liu et al., 2006).

### 1.3.6. Structure et fonction de la protéine CD133

Le marqueur de cellule souche neuronale CD133, appelé aussi Prominin-1, est une glycoprotéine membranaire divisée en cinq domaines trans-membranaires, deux larges boucles extracellulaires glycosylées, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytoplasmique (Corbeil et al., 2001) (Figure 5). Il a été récemment identifié que le domaine cytoplasmique est phosphorylé à la tyrosine-828 et la tyrosine-852 par les tyrosines kinases de la famille Src (Boivin et al., 2009). CD133 a été le premier membre identifié de la famille de protéines membranaires «prominin» (Weigmann et al., 1997). Les membres de cette famille se retrouvent de façon restreinte dans les protrusions de la membrane plasmique, telles que les microvilli des cellules épithéliales (Weigmann et al., 1997). La fonction spécifique de CD133 est incertaine. Selon la littérature, CD133 se retrouve à la membrane plasmique en des endroits enrichis en cholestérol et un rôle dans l'organisation de la membrane plasmique a été proposé (Roper, Corbeil et Huttner, 2000). De plus, la perte de l'expression de CD133 dans les cellules de la rétine de souris a résulté en une dégénération progressive des photorécepteurs suivie d'une perte complète de la vue (Zacchigna et al., 2009).

### 1.3.7. Mode de culture des cellules souches cancéreuses CD133(+)

L'avancement rapide des connaissances sur les CSC est en partie dû à l'adaptation et à l'application des méthodologies déjà développées pour l'étude des cellules souches normales, telles que les cellules souches neuronales. Différentes techniques de culture sont utilisées afin de conserver *in vitro* les propriétés des cellules souches ou des CSC dont l'auto-renouvellement et leur capacité à se différencier alors que d'autres techniques permettent d'isoler les CSC d'une population cellulaire (Figure 6).

#### *Culture des CSC CD133(+) en neurosphères*

Les conditions de culture en neurosphères facilitent l'étude des propriétés intrinsèques des cellules souches *in vitro*. Les cellules provenant de tumeurs humaines primaires ou de

lignées cellulaires stables sont cultivées en suspension (sans adhésion) dans un milieu de culture sans sérum, mais en présence de facteurs de croissance de fibroblaste (FGF), de facteur de croissance épidermal (EGF), de facteur de survie neuronale (NSF) et du facteur inhibiteur de leucémie (LIF) (Reynolds et Weiss, 1992). CD133 et la protéine cytoplasmique Nestine, deux marqueurs de cellules souches neuronales, sont fortement exprimées dans les conditions de culture en neurosphère (Ignatova et al., 2002; Galli et al., 2004).

#### *Enrichissement des cellules CD133(+) par tri cellulaire*

Il est possible de trier les cellules CD133(+) de tumeurs primaires ou de lignées cellulaires stables (Singh et al., 2003). Les cellules cancéreuses sont d'abord dissociées et incubées en présence d'un anticorps spécifique à CD133. L'anticorps est lui-même couplé à une bille magnétique. La population cellulaire totale est ensuite déposée à l'ouverture d'une colonne sous un champ magnétique intense. Seules les cellules CD133(+) restent prises dans la colonne. Les cellules CD133(+) peuvent ensuite être éluées et maintenues en culture. Cette population qui est enrichie en marqueur CD133 est cultivée en adhésion en présence de sérum ou en condition de culture neurosphère. La confirmation de l'enrichissement du tri s'effectue par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps CD133 couplé à un fluorophore.

#### **1.3.8. Essai néoplasique *in vivo***

Les cellules CD133(+) sélectionnées par la technique de neurosphère ou par tri cellulaire peuvent être implantées par stéréotaxie *in vivo* dans l'environnement cérébral de la souris. Ainsi, l'adaptation des CSC CD133(+) à leur microenvironnement peut être étudiée. Notre groupe a d'ailleurs montré que le marqueur CD133 est exprimé uniquement dans une masse tumorale provenant de cellules cancéreuses cérébrales implantées de façon orthotopique, soit dans l'environnement cérébral d'une souris. En effet, la protéine CD133 n'est pas exprimée lorsque ces cellules sont implantées sous la peau près de l'abdomen (Annabi et al., 2008).

#### **1.4. Voies de signalisation tumorale**

Le ciblage des CSC CD133(+) au sein d'une tumeur cérébrale implique une meilleure compréhension des voies signalétiques qui contribuent à leur capacité d'initier les tumeurs, de résister aux traitements actuels et de soutenir les processus de métastase. Les CSC

CD133(+) sont retrouvées en haute proportion dans les glioblastomes (près de 25% dans certains cas). Certaines protéines dont les acteurs de la voie NF- $\kappa$ B, la protéine COX-2 et les métalloprotéinases matricielles, dont MT1-MMP, sont spécifiquement retrouvées dans les tumeurs cérébrales de haut grade. Ces protéines pourraient être sous le contrôle principal des CSC CD133(+).

#### **1.4.1. Inflammation et cancer**

L'inflammation est reconnue depuis longtemps pour ses effets protecteurs pour les tissus contre les irritations, les blessures et les infections caractérisées par de la douleur et de la fièvre (Kumar et al., 2004). La réaction inflammatoire ponctuelle de courte durée a des conséquences thérapeutiques via, par exemple, l'activation de la défense naturelle du corps contre des organismes pathogènes étrangers. Cependant, lorsque l'inflammation devient chronique, c'est-à-dire que la réaction inflammatoire persiste sur une longue période de temps, elle devient dangereuse et prédispose à différentes maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'arthrite, la maladie d'Alzheimer et le cancer.

#### **1.4.2. La voie de signalisation NF- $\kappa$ B : le pont entre l'inflammation et le cancer**

Un des facteurs de transcription les plus importants dans l'initiation de la réponse immunitaire et inflammatoire est la protéine NF- $\kappa$ B (Facteur Nucléaire-kappa B). NF- $\kappa$ B joue un rôle crucial dans une variété de processus biologiques incluant les processus inflammatoires, le développement de la réponse immunitaire innée et adaptative, la neuroprotection et la dégénération, l'apprentissage et la cancérogenèse. Dans plusieurs cellules immunitaires, NF- $\kappa$ B régule les fonctions de la prolifération cellulaire, de la survie et du trafic vésiculaire en ciblant la transcription de différents gènes associés. L'activation constitutive de NF- $\kappa$ B est associée avec plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, le diabète et le cancer (Aggarwal, 2004).

Présentement, NF- $\kappa$ B consiste en une famille de protéines dont les membres sont RelA (appelé aussi P65), RelB, c-Rel, P50 (appelé aussi NF- $\kappa$ B1) et p52 (appelé aussi NF- $\kappa$ B2) pouvant former des complexes hétérodimériques et homodimériques (Widera et al., 2006). L'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B est dépendante de la présence du domaine d'activation

de la transcription Rel retrouvé dans les facteurs de transcription P65, RelB et c-Rel. Bien que la forme commune la plus active soit l'hétérodimère P50 et P65, une homodimérisation de P50 existe et joue comme répresseur vu l'absence d'un domaine de transactivation. Le dimère P50-P65 existe sous une forme inactive cytoplasmique lié à une protéine inhibitrice de la famille IκB. Ce complexe trimérique NF-κB-IκB peut être activé par différents stimuli comme des cytokines inflammatoires, des neurotransmetteurs ou des facteurs de croissance. L'activation du complexe NF-κB se déroule via la phosphorylation de la protéine IκB par les protéines IκB kinases (IKK). L'inhibiteur IκB sera par la suite ubiquitiné et dégradé par le protéasome. L'hétérodimère NF-κB actif transloque au noyau où il régule l'expression de plus de 200 gènes différents (Kaltschmidt, Widera et Kaltschmidt, 2005) (Figure 7).

Plusieurs carcinogènes, comme le 7,12 diméthyle-benz(a)anthracène (DMBA) ou la fumée de cigarette et des promoteurs de tumeurs de la famille des phorbols esters peuvent induire l'activation de NF-κB (Anto et al., 2002; Banerjee, Bueso-Ramos et Aggarwal, 2002). Aussi, le facteur tumoral nécrotique (TNF) influence la carcinogénèse via l'induction de la prolifération, l'invasion et les processus métastatiques des cellules cancéreuses. Le TNF est d'ailleurs l'activateur le plus puissant de NF-κB (Chen et al., 2002; Shishodia et al., 2003).

L'hétérodimère NF-κB est constitutivement actif dans la plupart des lignées cellulaires alors qu'il est activé sous différentes conditions dans les cellulaires immunitaires. L'activation constitutive de NF-κB n'est pas retrouvée uniquement dans les lignées cellulaires, mais aussi dans les tissus cancéreux de patients atteints de leucémie (Kordes et al., 2000), du cancer de la prostate (Palayoor et al., 1999), du cancer du sein (Nakshatri et al., 1997) et de glioblastome (Raychaudhuri et al., 2007). La suppression de NF-κB dans ces tumeurs *in vitro* inhibe la prolifération, cause l'arrêt du cycle cellulaire et mène à l'apoptose. Ces résultats soulignent les rôles cruciaux de NF-κB dans la prolifération et la survie cellulaire.

#### **1.4.3. NF-κB est un joueur clé de l'expression de la protéine COX -2**

L'aspirine est l'une des drogues anti-inflammatoires non stéroïdiennes (NSAID) la plus utilisée de par le monde. En 1970, Sir John Vane a élucidé les mécanismes anti-inflammatoires de l'aspirine. L'aspirine et autre NSAID inhibent les cyclooxygénases (COX)

qui jouent différents rôles importants dans les processus inflammatoires (Vane, 1971). Les COX sont majoritairement sous le contrôle de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Tsatsanis et al., 2006).

Des études subséquentes sur la biologie des enzymes COX ont mené à la distinction entre deux enzymes COX différentes, soit COX-1 (Yokoyama, Takai et Tanabe, 1988) et COX-2 (Xie et al., 1991). L'enzyme COX-1 est maintenue à un niveau d'expression basal nécessaire à l'homéostasie des tissus. De son côté, COX-2 est activée sous certaines conditions stressantes ou via l'action d'oncogènes. Les enzymes COX sont impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Dans la réaction initiale, COX catalyse la formation d'un intermédiaire instable appelé prostaglandine G<sub>2</sub> qui est par la suite convertit en prostaglandine H<sub>2</sub> par l'activité peroxidase de COX (Smith, DeWitt et Garavito, 2000). La prostaglandine H<sub>2</sub> est le précurseur de différentes prostaglandines produites par l'action de prostaglandines synthases spécialisées. Une prostaglandine ainsi produite est la PGE<sub>2</sub> qui est surexprimée dans plusieurs cancers et qui influence plusieurs processus cancéreux. Les prostaglandines exécutent leurs différents rôles en liant des récepteurs membranaires qui leur sont spécifiques, soient EP1-4.

L'enzyme COX-2 et les prostaglandines produites sont importantes pour un grand nombre de processus physiologiques normaux incluant la modulation de la réponse inflammatoire, la protection de la muqueuse gastro-intestinale, le maintien de l'homéostasie rénale et la régulation de la coagulation sanguine (Funk, 2001). Cependant, une expression soutenue de COX-2, via une activité transcriptionnelle constitutive de NF- $\kappa$ B, s'avère importante dans les processus carcinogéniques des gliomes. En effet, il se trouve qu'une augmentation de la prostaglandine PGE<sub>2</sub> au sein des gliomes est corrélée avec le grade tumoral des gliomes (Castelli et al., 1989; Paoletti et al., 1989). Il a aussi été démontré que l'augmentation du grade tumoral des gliomes corrèle avec un haut pourcentage de cellules exprimant COX-2. L'enzyme COX-2 retrouvée en forte abondance dans les tumeurs est signe d'un pronostic faible chez les patients atteints de glioblastome (Shono et al., 2001).

#### 1.4.4. Rôle de NF- $\kappa$ B et de COX-2 dans le cancer

La voie NF- $\kappa$ B et celle de COX-2/PGE2 influencent plusieurs des grandes signatures du cancer, dont l'autonomie en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, la résistance à l'apoptose et le soutien de l'angiogenèse tumorale (Figure 8).

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est utilisé par différents oncogènes ou différents facteurs de croissance/cytokines pour stimuler la croissance cellulaire. C'est le cas de la protéine oncogène Ras qui est activée constitutivement dans plusieurs cancers dont les gliomes (Russell et al., 2002) et qui stimule la croissance et la survie cellulaire via la phosphorylation de I $\kappa$ B puis l'activation subséquente de NF- $\kappa$ B (Mayo, Norris et Baldwin, 2001). Deux autres protéines clés de l'initiation tumorale, de la survie et de la prolifération cellulaire sont les oncogènes *c-myc* et Pim-2 dont les activités dans la carcinogénèse s'effectuent via NF- $\kappa$ B (Kim et al., 2000; Fox et al., 2003). De plus, les cytokines TNF et les interleukines 1 et 6, (Pahl, 1999) ainsi que le EGF (Biswas et al., 2000) activent NF- $\kappa$ B afin de promouvoir leur effet prolifératif. Du côté de la protéine COX-2, son activation aberrante mène à une surproduction de la PGE2 qui active constitutivement les voies Ras-MAPK (Pozzi et al., 2004) et la voie PI3K/Akt (Tessner et al., 2004), toutes deux impliquées dans la stimulation de la croissance, la prolifération et la survie cellulaire.

Un des mécanismes par lequel les signaux d'arrêt de croissance peuvent bloquer la prolifération cellulaire est en empêchant les cellules de quitter la phase G1 du cycle cellulaire qui maintient les cellules dans un état quiescent. Pour empêcher la séquestration des cellules cancéreuses en phase G1, NF- $\kappa$ B peut transcrire des gènes pro-mitotiques. Une des cibles de NF- $\kappa$ B est la cycline D1 utilisée par les cellules pour passer de la phase G1 à la phase S, soit le début de la division cellulaire (Toualbi-Abed et al., 2008). Un autre mécanisme qui dicte aux cellules d'entrer en arrêt de croissance est par l'implantation d'un programme de différenciation post-mitotique irréversible (Hanahan et Weinberg, 2000). Dans différentes tumeurs, une surexpression de la  $\beta$ -caténine via la voie WNT permet de bloquer ce programme de différenciation définitif. Des évidences récentes indiquent que la voie COX-2/PGE2 peut activer l'expression de la  $\beta$ -caténine (Castellone et al., 2005) et ainsi contourner les voies de différenciation et empêcher l'arrêt de croissance cellulaire.



Les cellules cancéreuses échappent à l'apoptose en exprimant différemment les protéines pro-apoptotiques ou pro-survies comparativement aux cellules saines. Une surexpression de protéines pro-survies déséquilibre la balance mort/survie et mène vers une prolifération cellulaire incontrôlée. Les protéines NF- $\kappa$ B et COX-2 peuvent supprimer l'apoptose en induisant l'expression de protéines pro-survies de la famille de BCL-2 telles que les protéines Bcl-2, Bcl-xL et A1 (Sheng et al., 1998; Mayo et Baldwin, 2000; Yang et al., 2003). NF- $\kappa$ B induit l'expression de protéines qui inhibent l'apoptose telles que la protéine inhibitrice de l'apoptose (c-IAP) (Chu et al., 1997), la caspase-8-c-FLIP (Kreuz et al., 2001) et les récepteurs au TNF (TRAF1-2) (Baud et Karin, 2001). De plus, COX-2/PGE2 activent des voies pro-survies telles que PI3K/AKT (Tessner, Muhale et al. 2004), Ras/MAPK/ERK (Pozzi, Yan et al. 2004) et l'activation du récepteur au facteur de croissance épidermal (EGFR) (Pai, Soreghan et al. 2002).

L'angiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est un processus complexe à plusieurs étapes qui nécessite, entre autres, le remodelage de la matrice extracellulaire ainsi que la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Sous des conditions normales, ce processus requiert une balance entre des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques qui attirent ou repoussent les cellules endothéliales. Parmi ces facteurs pro-angiogéniques figurent des facteurs de croissance et des chemokines. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B régule l'expression génique de différentes chemokines (ex. MCP-1, IL-8) et de facteurs de croissance (ex. TNF, VEGF, FGF) produits par les macrophages, les neutrophiles et d'autres cellules inflammatoires (Loch et al., 2001). Dans les glioblastomes, l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B mène aussi à la transcription de ces facteurs et influence l'angiogenèse tumorale (Chilov et al., 1997; Korkolopoulou et al., 2008). La surexpression de la voie COX-2/PGE2 mène aussi à l'induction de la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF (Tsujii, Kawano et al. 1998) soulignant l'importance de COX-2 et de NF- $\kappa$ B dans les processus d'angiogenèse tumorale.

### **1.5. Phénotype invasif des cancers cérébraux**

Un enjeu majeur propre aux gliomes malins est leur tendance à infiltrer le tissu sain adjacent aux tumeurs primaires dans le cerveau. En effet, cette nature invasive des gliomes joue un rôle important dans l'inefficacité des traitements présentement disponibles puisque

les cellules cancéreuses résistantes infiltreront inévitablement les tissus normaux environnants menant à la récurrence des tumeurs. Les métastases ainsi formées sont responsables de la majorité des décès associés aux gliomes (Nakada et al., 2007). Certains membres de la famille des métalloprotéinases matricielles sont impliqués dans les processus métastatiques et sont surexprimés dans les gliomes malins (Demuth et Berens, 2004).

### **1.5.1. Matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire (MEC), qui est en majorité détruite lors de l'invasion tumorale, est un environnement dynamique. En effet, la réorganisation normale ou pathologique de la MEC joue des rôles essentiels lors du développement embryonnaire, la réparation de tissu, l'inflammation, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et les métastases. La MEC est composée de collagènes, de glycoprotéines et de protéoglycanes ainsi que de plusieurs facteurs solubles impliqués dans la motilité tels que différents facteurs de croissance, cytokines et des molécules d'adhésion. La MEC est majoritairement dégradée par les métalloprotéinases matricielles (MMPs). La dégradation de la MEC par les MMPs n'augmente pas seulement l'invasion tumorale mais affecte aussi les comportements des cellules cancéreuses et mène à la progression du cancer (Figure 9).

### **1.5.2. Structure des métalloprotéinases matricielles**

Les métalloprotéinase matricielles (MMPs) se rassemblent en une famille multigénique de près de 25 membres connus à ce jour pouvant être divisée en 8 groupes, selon leurs différents domaines. Toutes les MMPs contiennent un pré-domaine à l'extrémité N-terminale requis pour leur sécrétion normale. Ce pré-domaine est suivi d'un pro-domaine qui maintient la forme latente de l'enzyme au contact d'un ion zinc. Cet ion zinc est essentiel à l'activité du domaine catalytique qui suit le pro-domaine. Le centre catalytique des MMPs contient un motif de liaison au zinc hautement conservé (Bjorklund et Koivunen, 2005). Ce domaine interagit avec les inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMP) et leurs substrats protéiques (Figure 10). Bien que la majorité des MMPs soit sécrétée, certaines d'entre elles contiennent un domaine transmembranaire utilisé comme site d'ancrage de ces protéines à la surface cellulaire. Ces MMPs transmembranaires (MT-MMP), en plus de leur domaine d'ancrage à la membrane plasmique, ont parfois un court domaine cytoplasmique (Stocker et al., 1995).



### 1.5.3. Rôles et régulation de la MT1-MMP

Parmi les différentes MMPs, plusieurs évidences montrent que la MT1-MMP est l'enzyme clé impliquée dans les processus d'invasion tumorale des gliomes (Nakano et al., 1995; Yamamoto et al., 1996). Ces rôles se situent dans la locomotion cellulaire, dans la dégradation de la MEC et dans les voies d'activation des MMPs solubles. L'invasion tissulaire contrôlée par MT1-MMP est directement liée à la carcinogénèse et aux métastases (Egeblad et Werb, 2002).

L'enzyme MT1-MMP est synthétisée sous forme zymogène et une activation protéolytique est requise pour cliver le groupe NH<sub>2</sub> terminal. La relâche de ce pro-domaine expose le site actif de MT1-MMP qui se révèle alors pleinement fonctionnel. MT1-MMP est régulée par plusieurs mécanismes différents incluant l'inhibition par les TIMPs, l'oligomérisation, le clivage protéolytique, la glycosylation, le trafic vésiculaire, l'internalisation et son recyclage (Jiang et al., 2001; Osenkowski, Toth et Fridman, 2004; Remacle et al., 2006).

MT1-MMP a une activité protéolytique à large spectre. Cette enzyme peut cliver de multiples cibles cellulaires ou extracellulaires. Une liste partielle des cibles clivables de la MT1-MMP inclue différentes MMPs dont la MMP-2 et la MMP-13, des protéines retrouvées dans la MEC, telles que le collagène, la fibronectine, la vitronectine et la laminine, des récepteurs membranaires dont CD44 et des cytokines ou des facteurs de croissance situés dans la MEC comme l'interleukine-8 et le facteur de croissance tissulaire (Rozanov et al., 2002; Nakamura et al., 2004; Egawa et al., 2006).

La surexpression d'une forme recombinante de MT1-MMP à l'aide d'un plasmide cause un changement phénotypique et augmente la carcinogénèse des cellules cancéreuses (Golubkov et al., 2006). Ces changements suggèrent que MT1-MMP régule plusieurs fonctions cellulaires et affectent, directement ou indirectement, un nombre de voies de signalisations cellulaires (D'Alessio et al., 2008). Ces voies de signalisation ne sont pas suffisamment caractérisées.

#### 1.5.4. Rôles de la MT1-MMP dans les signatures de gliomes invasifs

Les tumeurs de type glioblastome sont hautement invasives. La dégradation de la MEC est un préalable afin que les cellules cancéreuses infiltrent les tissus sains voisins et que les cellules endothéliales puissent migrer au lieu de la néovascularisation lors de l'angiogenèse tumorale. Plusieurs évidences s'accumulent et impliquent la famille des MMPs dans ces processus, en particulier MT1-MMP (Figure 8) et sa cible protéolytique MMP-2. Des études montrent une surexpression de l'expression de la MMP-2 dans les GBM. L'augmentation de MT1-MMP est aussi corrélée histologiquement avec le grade malin des gliomes (Lampert et al., 1998; Ozen et al., 2004).

Un modèle du rôle de MT1-MMP dans l'invasion des gliomes a été proposé (Fillmore, VanMeter et Broaddus, 2001). D'abord, des signaux cellulaires, tels que des facteurs de croissance, des molécules de la MEC et des changements de la morphologie cellulaire, convergent vers l'augmentation de l'expression des MMPs, dont MT1-MMP. Par la suite, MT1-MMP et la pro-MMP2 sont synthétisées et amenées vers la membrane plasmique des cellules tumorales. La MMP-2 est relâchée à l'extérieur des cellules alors que MT1-MMP s'ancore à la membrane. S'ensuit l'activation de la pro-MMP2 par MT1-MMP. Ce processus implique la formation d'un complexe ternaire entre MT1-MMP, TIMP2 et la pro-MMP2. La MMP-2 dégagée de son pro-domaine s'active et dégrade la MEC locale. MT1-MMP clive aussi la MEC indépendamment de la MMP-2. La voie ainsi ouverte vers les tissus voisins permet aux cellules tumorales de s'y infiltrer et d'initier les processus d'invasion et de métastase.

Outre le rôle classique de protéolyse exercée par le domaine catalytique extracellulaire de la MT1-MMP, son court domaine cytoplasmique a été associé à des activités de signalisation. De nouvelles fonctions sont associées au domaine intracellulaire de MT1-MMP incluant l'activation de la voie TGFbeta/Alk5 menant à l'angiogenèse via le PGE2 (Alfranca et al., 2008), la mobilisation du calcium intracellulaire (Fortier et al., 2008), la régulation de la balance entre la survie et la mort cellulaire (Belkaid et al., 2007; Fortier et al., 2008) et la radorésistance des cellules gliales (Wild-Bode et al., 2001). Plus récemment, notre groupe a montré que MT1-MMP est un joueur principal dans la formation de neurosphères dérivées de

médulloblastomes et est responsable du haut potentiel invasif des cellules CD133(+) (Annabi et al., 2008).

### **1.6. Concept de niche vasculaire**

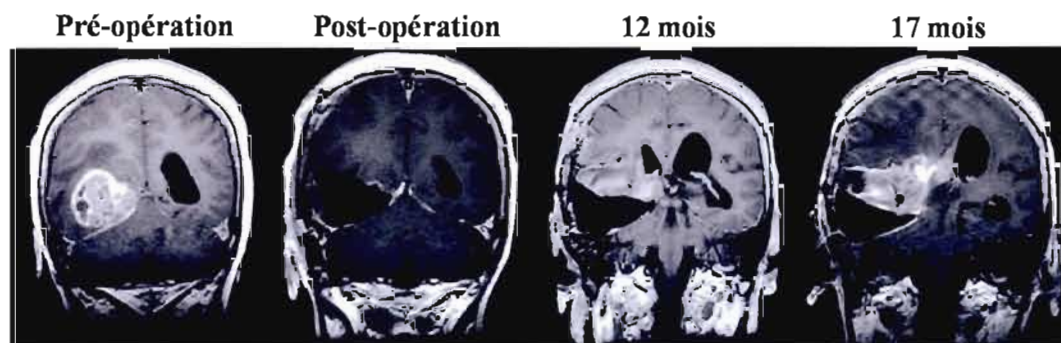
Les cellules souches normales et cancéreuses se retrouvent physiquement dans un microenvironnement particulier, ou niche, qui leur permet de maintenir leur état quiescent et de préserver leur potentiel à proliférer et à se différencier (Fuchs, Tumber et Guasch, 2004). Il est admis que la niche des cellules souches neuronales se situe normalement près d'un vaisseau sanguin. L'hétérogénéité cellulaire retrouvée dans la niche vasculaire génère une variété de molécules de signalisation qui contrôlent le nombre de cellules souches, leur prolifération et leur différenciation (Diabira et Morandi, 2008). Récemment, les CSC CD133(+) et Nestine(+) ont été identifiées près de capillaires sanguins (Calabrese et al., 2007) dans les tumeurs cérébrales. Cette même étude montre que les cellules endothéliales interagissent sélectivement avec les CSC CD133(+) et leur fournissent des facteurs qui maintiennent l'auto-renouvellement de ces CSC et leur état indifférencié.

Des évidences récentes suggèrent que la relation entre les CSC et la niche vasculaire soit bidirectionnelle : comme la niche peut supporter la croissance et le renouvellement des CSC, les CSC peuvent contribuer au maintien de la niche. Un groupe a montré que les CSC dérivées de gliomes sécrètent un niveau remarquablement élevé de VEGF, qui augmente significativement la migration des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Bao et al., 2006).

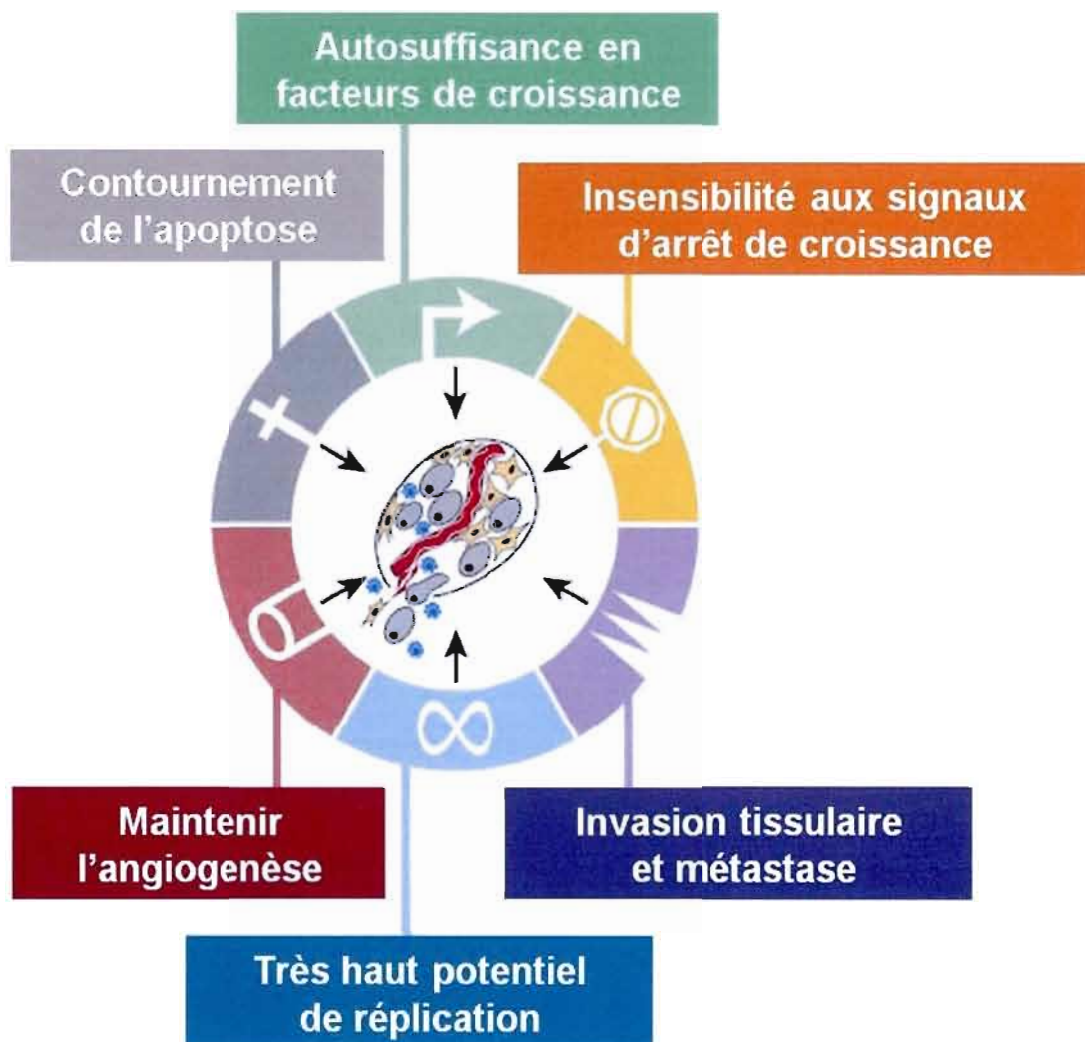
Une caractéristique connue de la niche vasculaire est que la tension d'oxygène y est très faible (entre 3% et 5%). L'hypoxie joue un rôle important dans la destinée des cellules souches car cette condition critique inhibe leur différenciation (D'Ippolito et al., 2006). L'hypoxie induit le facteur de transcription inductible hypoxique (HIF) activant plus de 100 gènes cruciaux impliqués dans l'adaptation à l'environnement hypoxique (Semenza et Wang, 1992). Il a été montré récemment que la voie COX-2/PGE2 est surexprimée par le microenvironnement hypoxique dans différents types de tumeurs via HIF (Kaidi et al., 2006). Ces nouvelles découvertes soulignent les rôles dans la carcinogénèse de la voie COX-2/PGE2 puisqu'elle promeut la survie cellulaire dans un environnement hypoxique, une propriété

essentielle que les cellules tumorales doivent acquérir afin de se propager et progresser *in vivo* (Vaupel, Mayer et Hockel, 2004). Aussi, la survie cellulaire des cellules cancéreuses sous condition hypoxique est contrôlée par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, l'hypoxie (Koong et al., 1994) et le PGE2 (Poligone et Baldwin, 2001) peuvent activer la transcription des membres transcriptionnels de NF- $\kappa$ B. De plus, puisque le manque d'oxygène et la signalisation COX-2/PGE2 régulent, indépendamment, la promotion de l'angiogenèse, il a été suggéré que la voie COX-2/PGE2 et l'hypoxie peuvent promouvoir en synergie les processus angiogéniques dans la niche vasculaire (Kaidi et al., 2006).

L'hypoxie, via HIF, induit l'angiogenèse tumorale (Giordano et Johnson, 2001). En effet, des évidences ont montré que l'expression de HIF en condition hypoxique est un stress cellulaire essentiel dans la surexpression de la MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP (Kondo et al., 2002; Fujiwara et al., 2007). La surexpression des MMPs peut promouvoir l'angiogenèse en modulant la MEC, en modifiant l'ancrage des cellules endothéliales, en influençant la prolifération, la migration et la croissance cellulaire par la relâche de facteurs de croissance tels que le VEGF et le FGF entreposés dans la MEC (Vu et al., 1998; Gerber et al., 1999; Fang et al., 2000). HIF induit aussi des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF (Jensen et al., 2006).

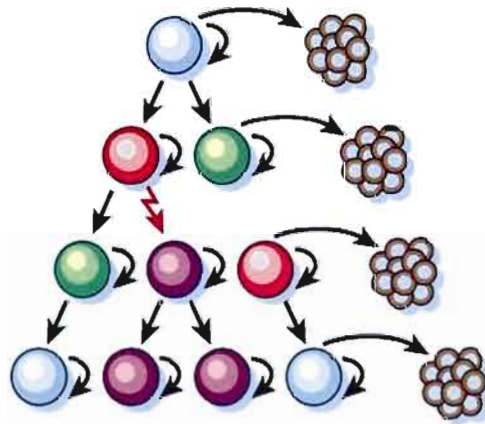


**Figure 1 : Récurrence locale des glioblastomes.** Un glioblastome du côté occipital droit (à gauche) a été retiré par chirurgie puis une imagerie par résonance magnétique (IRM) post-opératoire a été prise (centre gauche) afin de confirmer une résection sous-totale. Une radiothérapie et une chimiothérapie ont été administrées. Douze mois plus tard, une IRM routinière a décelé une tumeur récurrente adjacente à la cavité de la résection a été observée (centre droit). Dix-sept mois après l'opération, le patient mourrait (droit) (Nakada et al., 2007).

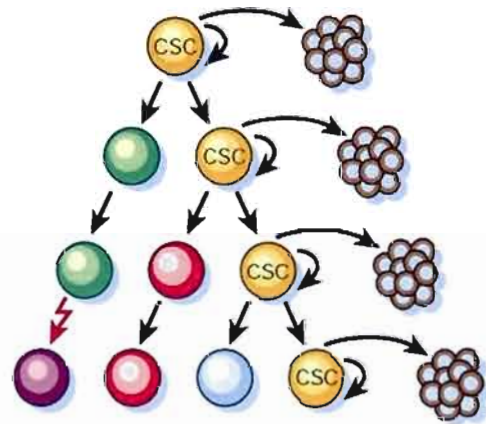


**Figure 2 : Signatures du cancer.** La majorité des cellules cancéreuses, lors de leur développement, acquièrent les six signatures du cancer. Cependant, les stratégies d'obtention de ces signatures peuvent varier d'un cancer à l'autre (Hanahan et Weinberg, 2000).

### A. Modèle Stochastique

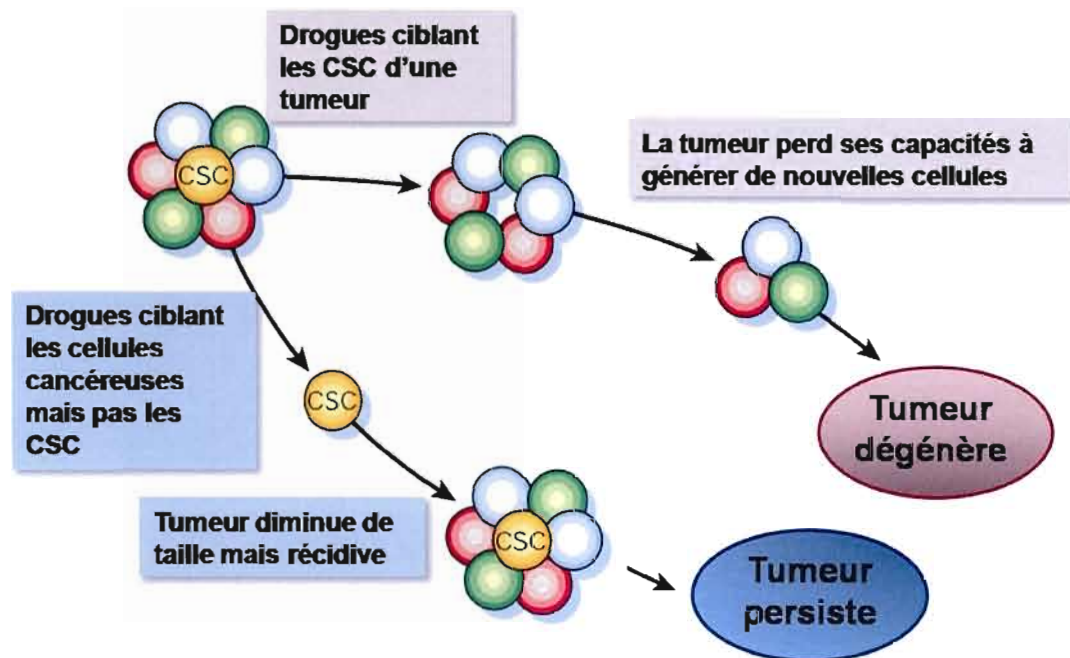


### B. Modèle des Cellules Souches Cancéreuses



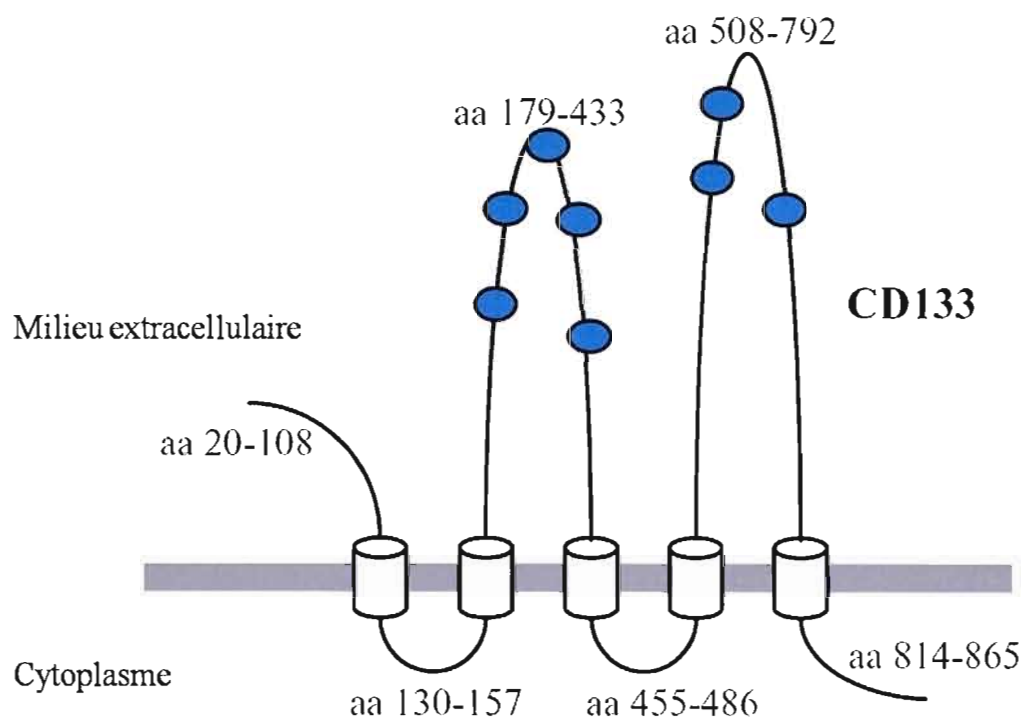
**Figure 3 : Deux modèles généraux de développement tumoral.** A. Le modèle stochastique stipule que les cellules de la masse tumorale sont relativement homogènes et la majorité des cellules peuvent proliférer sans limites et former de nouvelles tumeurs. B. Le modèle des cellules souches cancéreuses stipule que les cellules de la masse tumorale sont hétérogènes et seule une portion de cellules souches cancéreuses (CSC; jaune) ont la capacité de proliférer indéfiniment et de former de nouvelles tumeurs (Reya et al., 2001).



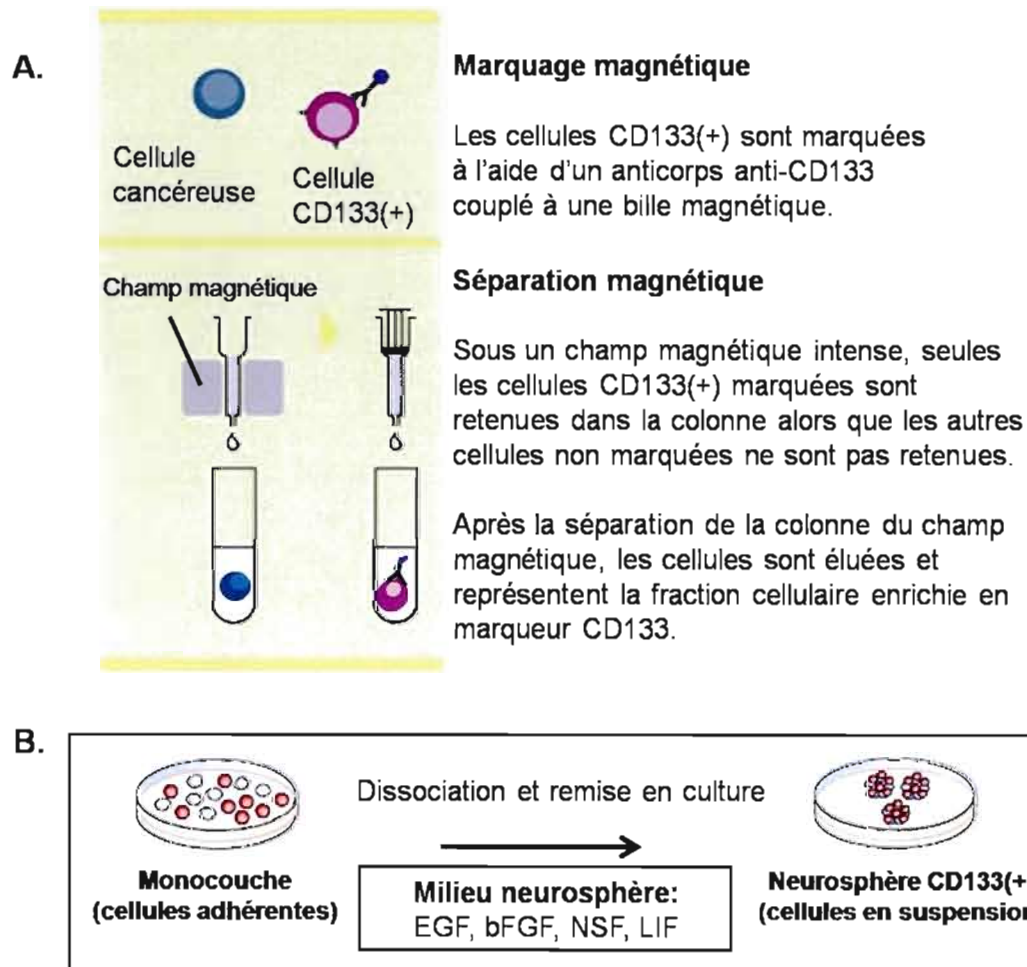


**Figure 4: Cibler les cellules souches cancéreuses pour de meilleurs pronostics en clinique.** Les thérapies conventionnelles diminuent la taille des tumeurs en ciblant les cellules avec un potentiel prolifératif limité. Comme les CSC sont moins sensibles à ces thérapies, elles resteront viables après les traitements et pourront rétablir la tumeur. Par contre, si les agents thérapeutiques peuvent cibler ou induire la différenciation des CSC, les tumeurs auront plus de difficulté à se maintenir et se développer. En effet, même si les thérapies ciblant les CSC ne diminuent pas initialement la taille des tumeurs, elles mèneront éventuellement à une guérison (Reya et al., 2001). (CSC : cellules souches cancéreuses)

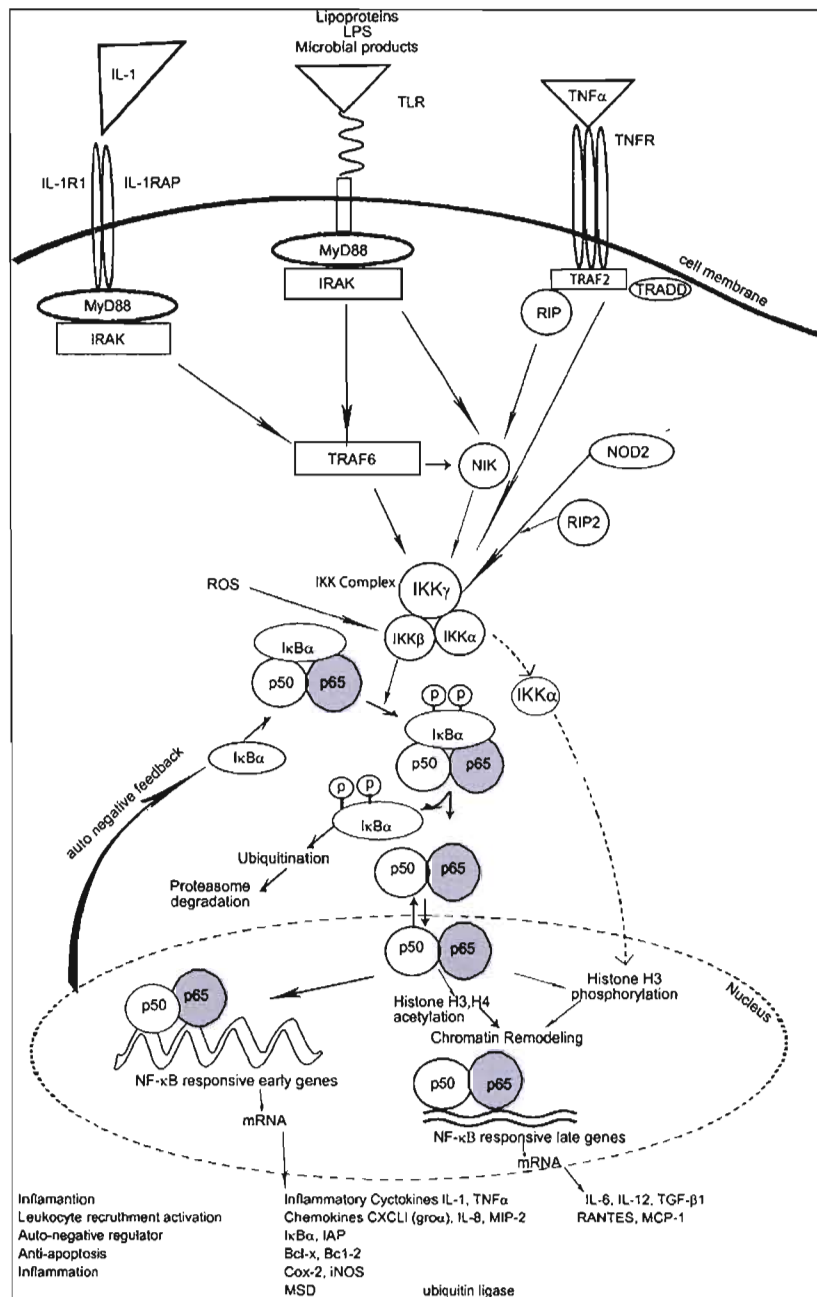




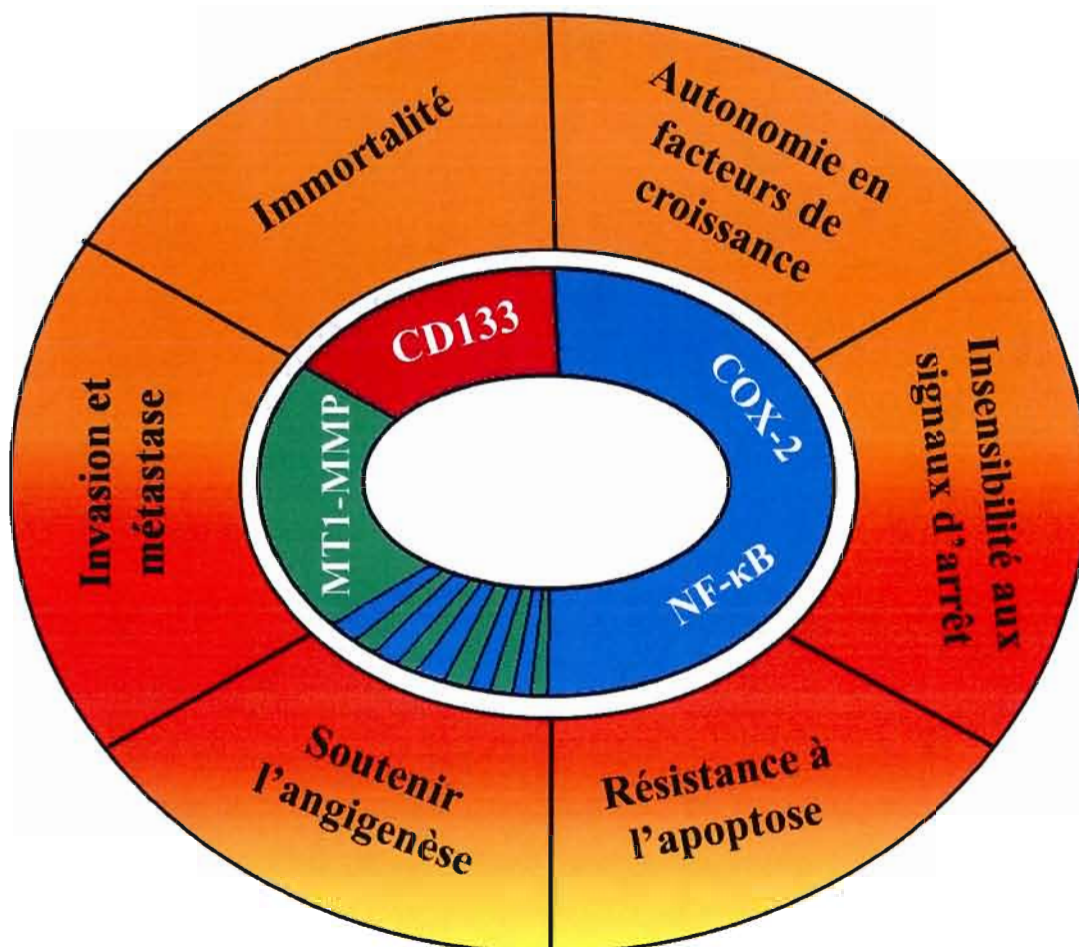
**Figure 5 : Topologie membranaire prédite de CD133.** Les cercles bleus indiquent les sites potentiels de glycosylation (Bidingmaier, Zhu et Liu, 2008).



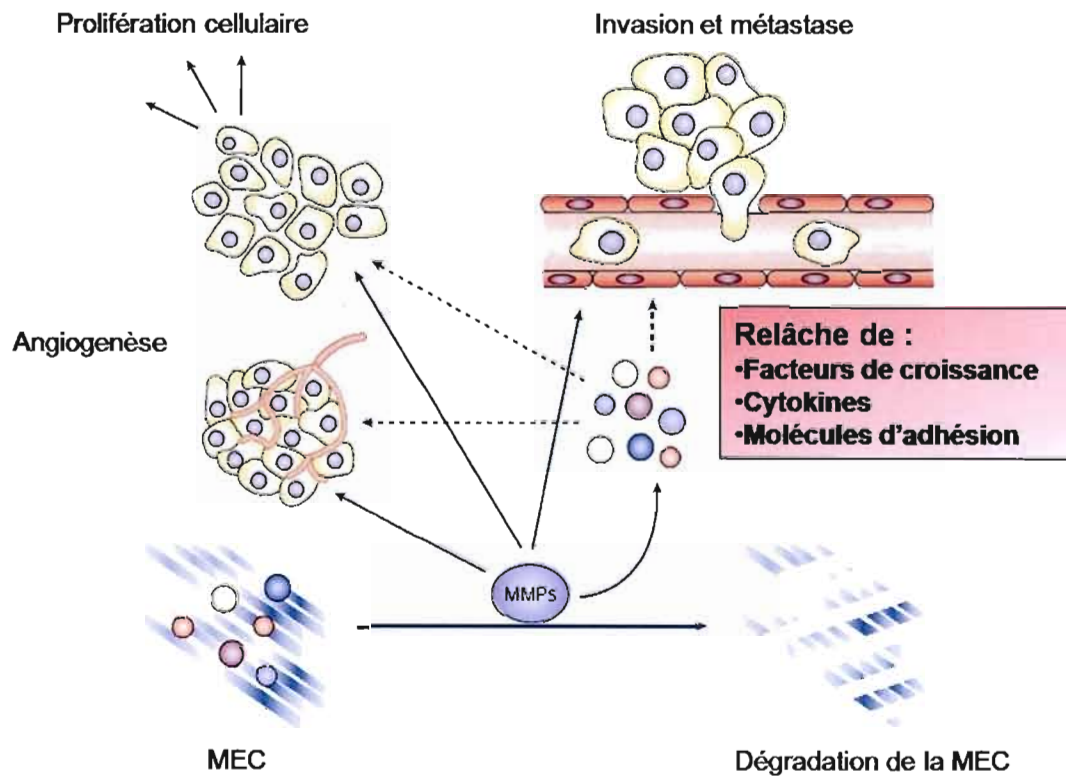
**Figure 6 : Deux techniques d'enrichissement de cellules CD133(+).** A) La technique de tri cellulaire implique l'incubation de la population cellulaire totale avec un anticorps CD133(+) couplé à une bille magnétique. Ces cellules marquées sont retenues à l'intérieur d'une colonne en présence d'un fort champ magnétique. B) La condition de culture neurosphère implique que les cellules sont dissociées puis cultivées en suspension dans un milieu enrichi en facteurs de croissance. Les agrégats de cellules ainsi formés sont des neurosphères exprimant le marqueur CD133.



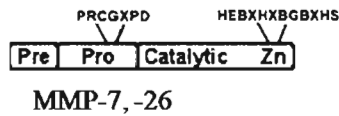
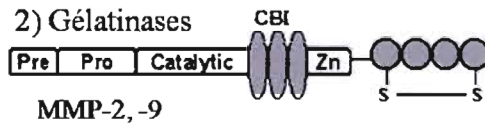
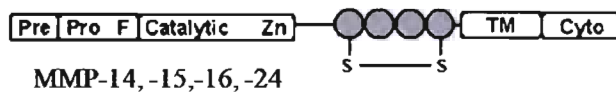
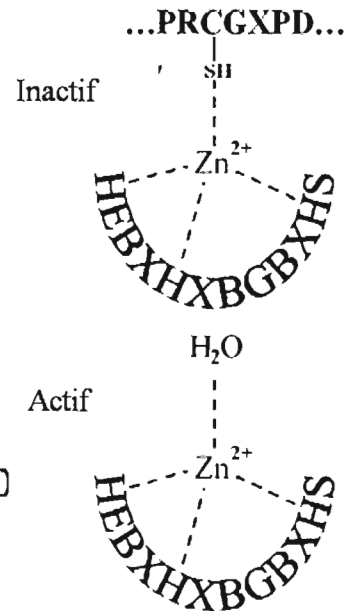
**Figure 7 : Mécanismes moléculaires menant à l'activation de NF-κB.** Les sous-unités P50-P65-IκB forment un complexe trimérique latent. Différents signaux stimulateurs de la voie NF-κB agissent sur l'activation du complexe IKK qui phosphoryle et induit la dégradation de l'inhibiteur IκB-α par le protéasome. Le complexe dimérique actif P50-P65 transloque au noyau afin d'activer la transcription de plus de 200 gènes cibles (Krakauer, 2008).



**Figure 8 : Rôles et phénotypes associés à NF-κB, COX-2, MT1-MMP et CD133 dans les cancers.** CD133 est un marqueur de surface des cellules souches qui expriment normalement la télomérase ce qui leur confère un potentiel de réplication infini. Le facteur de transcription NF-κB régule l'expression de COX-2. Lorsque NF-κB et COX-2 sont constitutivement activées dans une cellule cancéreuse, ces protéines sont impliquées dans l'acquisition de l'autonomie en facteur de croissance, dans la résistance à l'apoptose et aux signaux d'arrêt de croissance ainsi que dans le soutien de l'angiogenèse tumorale. Pour sa part, la surexpression de MT1-MMP participe à l'invasion tissulaire et aux processus métastatiques. MT1-MMP, via son domaine cytoplasmique, serait impliquée dans la transduction de signaux intracellulaires dont les caractéristiques principales restent encore méconnues.



**Figure 9 : Dégradation de la MEC et promotion de la croissance tumorale par les MMPs.** Les MMPs stimulent la croissance des cellules cancéreuses via l'interaction avec les composés de la matrice extracellulaire (MEC). Les MMPs contribuent à l'angiogenèse en augmentant la biodisponibilité des facteurs pro-angiogéniques. Les MMPs régulent aussi l'invasion et la migration en dégradant les composés structuraux de la MEC (Rao, 2003).

**A.****1) Domaines minimaux des MMPs****2) Gélatinases****3) MMPs transmembranaire****B.**

**Figure 10: Structure générale des MMPs et illustration de leur site catalytique.** A) Domaines structuraux des MMPs gélatinases et de type membranaire. Pre, séquence signal; Pro, propeptide; Zn, site de liaison de l'ion-zinc. B) Architecture du site catalytique des MMPs. Le groupe thiol de la cystéine présente dans la séquence PRCGXPD de la structure du propeptide interagit avec l'ion-zinc catalytique résultant en la forme latente des MMPs. Lors de l'activation, une molécule d'eau remplace le groupe thiol (Bjorklund et Koivunen, 2005; Société-canadienne-du-cancer, 2008).



## **CHAPITRE II**

### **PRÉSENTATION DU PROJET**

Plusieurs évidences lient la sous-population tumorale de CSC CD133(+) à la source des tumeurs cérébrales. Elles sont impliquées dans l'initiation, le maintien et l'expansion de ces cancers. Pour y parvenir, les CSC CD133(+) semblent acquérir chacune des signatures des cancers, soit l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de croissance, la résistance aux mécanismes d'apoptose, le potentiel de réplication infini, le soutien à l'angiogenèse tumorale et la capacité à envahir les tissus et métastaser. De plus, la population CD133(+) retrouvée dans les gliomes de haut grade (GBM) semble être responsable de la résistance aux traitements de radio-chimiothérapie. Cependant, les protéines associées à ces différentes fonctions des CSC CD133(+) sont inconnues. La protéine COX-2, la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et la protéine MT1-MMP sont aussi retrouvées dans les gliomes de hauts grades et prédisent de mauvais pronostics chez les patients atteints de GBM. La convergence des rôles de ces protéines dans la carcinogénèse pourrait permettre aux CSC CD133(+) d'adhérer à chacune des signatures du cancer et influencer leur comportement face aux traitements cytotoxiques.

De plus en plus d'évidences tendent à montrer que MT1-MMP ne joue pas exclusivement un rôle de protéase mais serait aussi impliquée dans la transduction de signaux intracellulaires. Les différents rôles de la MT1-MMP et de COX-2 portent à croire qu'elles soient deux enzymes clés des différentes propriétés de résistance et d'invasion des CSC CD133(+). Compte tenu de ces informations, nous avons examiné si les cellules CD133(+) de glioblastomes présentent une expression accrue de MT1-MMP et de COX-2 et avons étudié l'existence d'un axe de signalisation MT1-MMP/COX-2. À ce jour, bien que des corrélations entre ces deux protéines aient été avancées (Kuge et al., 2007; Vardar-Sengul et al., 2008), aucun lien moléculaire n'a encore été démontré entre MT1-MMP et COX-2.

Objectif 1 : Caractériser l'expression de MT1-MMP et de COX-2 dans les CSC CD133(+) dérivées de glioblastome

Nous avons évalué, dans un premier temps, l'expression protéique de CD133, COX-2 et MT1-MMP dans la lignée cellulaire U87 de GBM en condition de culture neurosphères. Nous montrons que les neurosphères CD133(+) ont un profil d'expression accrue en MT1-MMP et en COX-2 lors d'expérience d'immunobuvardage de type Western blot. Nous avons aussi observé ces mêmes marqueurs dans la lignée cellulaire de glioblastome U87 enrichie en CD133 à l'aide du tri cellulaire. Dans un même ordre d'idée, une population enrichie en cellules CD133(+) corrèle avec une expression génique élevée de MT1-MMP et de COX-2 comparativement aux cellules parentales.

Afin de dévoiler un lien moléculaire entre MT1-MMP et COX-2, nous avons surexprimé MT1-MMP à l'aide de sa forme recombinante contenue dans un vecteur d'expression dans les cellules U87 cultivées en monocouches ou en condition neurosphères. Nous montrons une augmentation significative de l'expression génique et protéique de COX-2 lors de la surexpression de MT1-MMP. De plus, l'inhibition de la traduction de MT1-MMP à l'aide d'un ARN interférent diminue le niveau d'expression protéique de COX-2 en deçà du niveau basal chez les neurosphères.

**Objectif 2 : Étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de COX-2 via MT1-MMP dans les CSC CD133(+)**

Afin de questionner si le domaine catalytique ou la région cytoplasmique de MT1-MMP jouent un rôle dans la surexpression de COX-2, les U87 ont été traitées à l'aide de l'Ilomastat, une molécule inhibitrice à large spectre de la fonction catalytique des MMPs dont la MT1-MMP. La transfection de la forme recombinante de MT1-MMP dans les cellules traitées à l'Ilomastat induit tout de même l'expression de COX-2. Ce résultat indique que la transduction des signaux via le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est indépendante de son domaine catalytique.

Pour étudier une voie de signalisation empruntée par MT1-MMP dans la régulation de l'expression de COX-2, nous avons eu recours à des cellules de fibroblaste d'embryon de souris (MEFs) mutées pour différents membres de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B dont les membres P50 et P65 (MEF-P50<sup>-/-</sup> et P65<sup>-/-</sup>). À l'aide de ces outils, nous avons montré que la protéine P50 est essentielle, et non la protéine P65, au cheminement du signal de MT1-MMP vers la transcription du gène de COX-2.



### CHAPITRE III

#### ARTICLE

#### **A MT1-MMP/NF- $\kappa$ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells**

Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, Carl Laflamme<sup>1¶</sup>, Asmaa Sina<sup>1</sup>, Marie-Paule Lachambre<sup>2</sup>, and Richard Béliveau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BIOMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada,* <sup>2</sup>*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Department of Neurosurgery, CHUM and UQAM, Montreal, Québec, Canada*

Article publié dans le journal scientifique *Journal of Neuroinflammation*

**A MT1-MMP/NF- $\kappa$ B signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133(+) U87 glioblastoma cells**

Borhane Annabi<sup>1¶</sup>, Carl Laflamme<sup>1¶</sup>, Asmaa Sina<sup>1</sup>, Marie-Paule Lachambre<sup>2</sup>, and Richard Béliveau<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de Recherche BIOMED, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada,* <sup>2</sup>*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Department of Neurosurgery, CHUM and UQAM, Montreal, Quebec, Canada*

¶ These authors contributed equally to this work

\* To whom correspondence and reprint requests should be directed

Laboratoire de Médecine Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone : (514) 987-3000 ext 8551

Fax : (514) 987-0246

E-mail : [beliveau.richard@uqam.ca](mailto:beliveau.richard@uqam.ca)

*Running title* : COX-2 expression in glioblastoma cancer stem cells

**Authors' contributions**

BA has conceived, designed, analyzed and interpreted the data of this study. CL has acquired, analyzed, and was involved in drafting the manuscript. AS and MPL have acquired the data. RB has conceived, designed and supported financially this study. All authors read and approved the final version of this manuscript.

## Abstract

**Background :** The CD133(+) stem cell population in recurrent gliomas is associated with clinical features such as therapy resistance, blood-brain barrier disruption and, hence, tumor infiltration. Screening of a large panel of glioma samples increasing histological grade demonstrated frequencies of CD133(+) cells which correlated with high expression of cyclooxygenase (COX)-2 and of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). **Methods :** We used qRT-PCR and immunoblotting to examine the molecular interplay between MT1-MMP and COX-2 gene and protein expression in parental, CD133(+), and neurospheres U87 glioma cell cultures. **Results :** We found that CD133, COX-2 and MT1-MMP expression were enhanced when glioma cells were cultured in neurosphere conditions. A CD133(+)-enriched U87 glioma cell population, isolated from parental U87 cells with magnetic cell sorting technology, also grew as neurospheres and showed enhanced COX-2 expression. MT1-MMP gene silencing antagonized COX-2 expression in neurospheres, while overexpression of recombinant MT1-MMP directly triggered COX-2 expression in U87 cells independent from MT1-MMP's catalytic function. COX-2 induction by MT1-MMP was also validated in wild-type and in NF- $\kappa$ B P65<sup>-/-</sup> mutant mouse embryonic fibroblasts, but was abrogated in NF- $\kappa$ B1 (P50<sup>-/-</sup>) mutant cells. **Conclusions :** We provide evidence for enhanced COX-2 expression in CD133(+) glioma cells, and direct cell-based evidence of NF- $\kappa$ B-mediated COX-2 regulation by MT1-MMP. The biological significance of such checkpoint control may account for COX-2-dependent mechanisms of inflammatory balance responsible of therapy resistance phenotype of cancer stem cells.

## Background

Despite significant improvements, current therapies have yet to cure infiltrative gliomas. Therapy resistance is possibly attributable to cancer stem cells (CSC), a small subpopulation of cells within the brain tumor mass responsible for the initiation and maintenance of the tumor [1]. Recently, small populations of CSC in adult and pediatric brain tumors were identified and, once isolated from tumor tissues, formed neurospheres when cultured *in vitro* [2, 3]. Based upon their high expression of the neural precursor cell surface marker CD133 (prominin-1), these CSC have been further hypothesized to bear properties such as resistance to apoptosis and resistance to both drugs and ionizing radiation [4, 5]. While the brain tissue microenvironmental niche is a prerequisite for expression of the stem cell marker CD133 antigen in brain tumors [6], its expression level is also thought to predict clinical outcome in glioma patients [7, 8].

High cyclooxygenase (COX)-2 expression is another condition associated with clinically more aggressive gliomas and is, along with CD133, a strong predictor of poor survival [9, 10]. COX-2 is an inducible enzyme responsible for prostaglandin production at sites of inflammation [11, 12]. In human glioblastoma, COX-2 performs important functions in tumorigenesis [13] and inhibitors of eicosanoid biosynthesis have been shown to suppress cell proliferation and to promote astrocytic differentiation [14]. Since COX-2 protein is overexpressed in the majority of gliomas, it is therefore considered to be an attractive therapeutic target [15, 16]. In fact, enhancement of glioblastoma radioresponse by the selective COX-2 inhibitor celecoxib was recently reported [17]. Paradoxically, the effectiveness of COX-2 inhibitors on glioma cell proliferation and radioresponse enhancement was also found to be independent of COX-2 protein expression [18]. This evidence suggests that alternate signaling molecules are associated to therapy resistance and involved in regulating COX-2 expression. These alternate molecules may possibly become attractive therapeutic targets.

Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP) constitute a growing subclass of MMP [19]. While most of the MMP are secreted, the MT-MMP are membrane-associated and a number of these have cytoplasmic domains which are important in cellular signaling [20-22]. MT1-MMP is the best-characterized MT-MMP. In addition to activation of proMMP-2, MT1-MMP displays intrinsic proteolytic activity towards extracellular matrix (ECM) molecules. The increased expression levels of several members of the MMP family have been shown to correlate with the graded level of gliomas, including MT1-MMP. Aside from its classical roles, many new functions of MT1-MMP were recently demonstrated, including a role in PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis [23], platelet-mediated calcium mobilization [24], regulation of cell death/survival bioswitch [22, 25], and radioresistance in both glioma cells [26, 27] and endothelial cells [28]. Finally, the recent demonstration that MT1-MMP also plays a role in medulloblastoma CD133(+) neurosphere-like formation and increased invasiveness [6] reinforces the need to design new therapeutic strategies that either directly target MT1-MMP functions or its associated signaling functions.

In the present study, we examined whether CD133(+) U87 glioma cells are characterized by increased COX-2 and MT1-MMP expression, and whether a potential MT1-MMP/COX-2 signalling axis might be important with respect to the therapy-resistant phenotype of CSC.

## Methods

### Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against CD133 and COX-2, and the monoclonal antibody against GAPDH were purchased from Abcam (Cambridge, MA) and Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA) respectively. The polyclonal antibody against MT1-MMP (AB815) was from Chemicon (Temecula, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

### Cell culture and neurosphere-like formation

The human U87 glioblastoma cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 10% (v/v) calf serum (CS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C with 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Neurosphere-like formation was triggered in a defined serum-free neural stem cell medium [29] containing Ex Vivo 15 (Lonza, Walkersville, MD), 20 ng/ml basic fibroblast growth factor, 20 ng/ml of epidermal growth factor (Wisent, St-Bruno, QC), 20 ng/ml leukemia inhibitory factor (Sigma, Oakville, ON) and 1X neural survival factor-1 (Lonza, Walkersville, MD). Murine L929 (L) cells were maintained as previously described [30]. NF- $\kappa$ B P50<sup>-/-</sup> and P65<sup>-/-</sup> immortalized fibroblasts were obtained from Dr David Baltimore (California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA).

### Magnetic cell sorting and flow cytometry

Confluent U87 glioma parental cells were harvested with cell dissociation buffer (Hank's based; Invitrogen), centrifuged at 800 x g for 5 min and resuspended in 1x PBS with 0.5% BSA and 2 mM EDTA. Magnetic labeling with 100  $\mu$ l AC133 (CD133/1) Microbeads per  $10^8$  cells was performed for 30 minutes at 4°C using a CD133 Direct Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Fifty  $\mu$ l of 293C3 (CD133-2)-phycoerythrin (fluorochrome-conjugated mouse monoclonal IgG2b; Miltenyi Biotec) was added for an additional 10 min at 4°C to evaluate the efficiency of magnetic separation by flow cytometry. Magnetic separation was carried out using LS columns and a MACS separator (Miltenyi Biotec) under a biological hood. CD133(+) fractions were eluted by removing the column from the magnetic field and using a sterile plunger. Aliquots of CD133(+)-sorted cells were evaluated for purity by flow cytometry with a FACSCalibur machine (BD Biosciences). CD133(+)-sorted cell populations were resuspended in SFM with growth hormones.

#### **Total RNA isolation and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis**

Total RNA was extracted from monolayers or neurosphere-like cells using TRIzol reagent (Life Technologies). For cDNA synthesis, 1  $\mu$ g total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C until PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 machine (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. All the primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, 18S ribosomal RNA, was measured by following a  $\Delta C_T$  method. An amplification plot comparing fluorescence signal vs. cycle number was drawn. The difference ( $\Delta C_T$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of 18S ribosomal RNA were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta C_T}$ .



### **RNA interference**

RNA interference experiments were performed using HiPerFect (QIAGEN, Valencia, CA). A small interfering RNA (siRNA; 20 nM) against MT1-MMP (siMT1-MMP) and mismatch siRNA were synthesized by EZBiolab Inc. (Westfield, IN), and annealed to form duplexes. The sequence of the siMT1-MMP used in this study was derived from the human MT1-MMP gene (NM\_004995) and is as follows : 5'-CCAGAAGCUGAAGGUAGAAAdTdT-3' (sense) and 5'-UUCUACCUUCAGCUUCUGGdTdT-3' (antisense) [31]. Evaluation of the transient knockdown duration was performed by real-time quantitative RT-PCR and the targeted gene expression was found to be routinely diminished by 65-90% 24 to 48 hrs post-transfection (not shown).

### **Cell transfection method**

Sub-confluent U87 monolayer cells were transiently transfected with 10 µg of the cDNA encoding full length (Wt) MT1-MMP fused to GFP [22] using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON). Mock transfections of U87 cultures with the empty vector, pcDNA (3.1+), were used as controls. Transfected cells were left to recuperate and were used 48 hrs post-transfection. MT1-MMP specific gene expression and function was evaluated by semi-quantitative RT-PCR and immunoblotting procedures, and was validated by assessing MT1-MMP-mediated proMMP-2 activation by gelatin zymography.

### **Gelatin zymography**

Gelatin zymography was used to assess the extracellular levels of proMMP-2 and MMP-2 activities. Briefly, an aliquot (20 µl) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/ml gelatin. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H<sub>2</sub>O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 and then stained with

0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H<sub>2</sub>O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

### **Immunoblotting procedures**

Proteins from control and treated cells were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Baie d'Urfée, QC).

## Results

### **CD133, COX-2 and MT1-MMP expression is increased in neurosphere-like U87 glioma cultures**

Neurosphere-like brain CSC are thought to contribute to a sub-population of CD133(+) brain CSC [32]. Neurosphere induction in U87 cells was performed according to established protocols [33, 34]. This process promoted the transition of adherent monolayer cells to non-adherent, neurosphere-like cells (Fig.1a). Immunodetection of CD133, COX-2 MT1-MMP and GAPDH was performed on the cell lysates. Neurosphere culture conditions induced CD133 and COX-2 expression in U87 cells when compared to their corresponding monolayer cultures (Fig.1b). MT1-MMP expression was also induced during neurosphere-like formation, while the house-keeping gene GAPDH remained unaffected (Fig.1b). Since MT1-MMP is known to activate proMMP-2 into MMP-2, the levels of latent proMMP-2 and active MMP-2 were also assessed in those same serum-starved monolayer and neurosphere culture conditions. We observed that proMMP-2 activation in U87 neurospheres remained unchanged. Therefore, increased MT1-MMP seems to occur independent of its capacity to induce proMMP-2 activation, suggesting that MT1-MMP may regulate alternate intracellular processes. Collectively, increased CD133, COX-2 and MT1-MMP expression characterizes neurosphere-like formation in U87 glioma cells.

### **Cell-based evidence that MT1-MMP directly regulates COX-2 expression in U87 glioma cell lines**

In light of the correlation between MT1-MMP and COX-2 expression observed in U87 glioma neurospheres, we next sought to assess whether MT1-MMP regulates COX-2 expression. U87 cell monolayers were transiently transfected with either a cDNA plasmid encoding recombinant MT1-MMP or with siRNA against MT1-MMP. Cells were then trypsinized and cultured as monolayers or neurospheres as described in the Methods section. Conditioned media from serum-starved cells was harvested in order to monitor the extent of secreted proMMP-2 and MMP-2 levels by gelatin zymography and cell lysates were used for

COX-2 and GAPDH immunoblotting. We found that MT1-MMP was effectively overexpressed under all conditions as it triggered proMMP-2 activation into MMP-2 (Fig.2a, upper panel). When COX-2 protein levels were assessed under those same experimental conditions, we found that overexpression of MT1-MMP also triggered COX-2 expression (Fig.2a, middle panel). While basal neurosphere culture conditions re-confirmed COX-2 expression in U87 cells, the neurosphere culture conditions in which MT1-MMP gene expression was downregulated (siMT1-MMP) were not associated with increased COX-2 expression (Fig.2a, middle panel). COX-2 gene expression levels were also assessed by qRT-PCR as described in the methods section using total RNA isolated from U87 monolayers and neurospheres cultures treated as in Fig.2a. We observed a good correlation between COX-2 gene and protein expression (Fig.2b) suggesting that COX-2 transcriptional regulation is involved during neurospheres formation and that this is performed through an MT1-MMP-mediated signaling.

### **CD133-sorted U87 glioma cells grow as neurospheres and express high levels of COX-2**

In order to evaluate the potential contribution of the CD133(+) cell subpopulation to the MT1-MMP/COX-2 signalling axis, we used magnetic cell sorting (MACS) technology to isolate CD133(+) cells from the parental U87 glioma cell population. We found that the CD133(+) U87 cell population represented ~0.15% of the total parental U87 glioma cells (Fig.3a, left panel). Sorting of the CD133(+) cells was then performed and we evaluated the cells as being ~27% CD133 positive (Fig.3a, right panel). The isolated subpopulation, with an enrichment of ~180-fold for CD133(+) U87 cells, was put into culture. Cell morphologies of the parental and CD133(+) U87 glioma cells were compared and we observed that the CD133(+) cells formed spontaneous neurospheres (Fig.3b), a characteristic of brain CSC in agreement with previous reports [33, 35]. Total RNA was isolated from both parental and CD133(+) glioma cells in order to assess gene expression levels of CD133, COX-2, and  $\beta$ -Actin. We found that CD133 gene expression was increased by ~6-fold in the sorted CD133(+) U87 glioma cells (Fig.3c), in agreement with the increased CD133 cell surface

expression (Fig.3a). Moreover, MT1-MMP and COX-2 gene expression were also increased by ~4-fold in CD133(+) U87 cells (Fig.3c).

### **MT1-MMP-mediated regulation of COX-2 expression is independent of MT1-MMP's catalytic functions**

In order to investigate the molecular mechanism involved in MT1-MMP's regulation of COX-2, we first assessed the implication of its catalytic function. U87 glioma cells were transfected with a cDNA encoding MT1-MMP, and then treated (or not) with Ilomastat, a broad-spectrum MMP catalytic inhibitor. Transfection efficacy was confirmed by the appearance of the recombinant MT1-MMP protein by Western blotting (Fig.4a, upper panel). Gelatin zymography further confirmed the appropriate targeting of MT1-MMP to the cell surface since its extracellular catalytic domain triggered proMMP-2 conversion into its active MMP-2 form (Fig.4a, middle panel). As expected, treatment of MT1-MMP-transfected cells with Ilomastat abrogated proMMP-2 activation (Fig.4a, middle panel). COX-2 expression was induced by MT1-MMP overexpression, but was insensitive to Ilomastat's inhibition of cell surface MT1-MMP activity (Fig.4a, lower panel). These results suggest that MT1-MMP's extracellular catalytic functions are not required for inducing COX-2 expression and necessitate an alternative intracellular signaling mechanism triggered by MT1-MMP's intracellular domain. Accordingly, overexpression of a cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP [20, 21] was unable to trigger COX-2 expression (not shown). Total RNA was next isolated and COX-2 transcriptional regulation assessed upon MT1-MMP overexpression in U87 cells. We observed that transfected cells overexpressing MT1-MMP had significantly elevated levels of COX-2 transcripts (Fig.4b). The possible involvement of nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B)-intracellular signaling in MT1-MMP-mediated COX-2 transcriptional regulation was next considered.

### **COX-2 induction by MT1-MMP occurs through NF- $\kappa$ B-mediated mechanisms**

MT1-MMP was previously demonstrated to possess the ability to trigger intracellular signaling through its 20 amino acid intracellular domain [20-22]. Moreover, COX-2 transcriptional expression is thought to be regulated, in part, through NF- $\kappa$ B-mediated signaling involving nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B heterodimer P50:P65 [36]. Wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEF) as well as P50<sup>-/-</sup> and P65<sup>-/-</sup> NF- $\kappa$ B mutants were used to assess MT1-MMP involvement in COX-2 expression. Cell lysates as well as conditioned media were isolated from Mock-transfected and MT1-MMP-transfected cells. Expression and cell surface activity of the recombinant MT1-MMP were confirmed in transfected cells as Wt, P50<sup>-/-</sup> and P65<sup>-/-</sup> cells all exhibited increased proMMP-2 activation into its active MMP-2 form as judged by gelatin zymography (Fig.5, upper panel). When COX-2 protein expression was assessed, we observed the induction of COX-2 by MT1-MMP in Wt-MEF (Fig.5, middle panel) confirming the results observed in U87 glioma cells (Fig.4a). Similar MT1-MMP-mediated COX-2 induction was also observed in P65<sup>-/-</sup> mutant MEF but COX-2 expression was completely abrogated in P50<sup>-/-</sup> mutant MEF (Fig.5, middle panel). This cell-based evidence directly demonstrates the specific involvement of P50 in NF- $\kappa$ B-mediated MT1-MMP regulation of COX-2 expression.

## Discussion

Overexpression of COX-2, the enzyme responsible for the synthesis of prostaglandin subtype PGE<sub>2</sub>, has been found to be important in the development of several human tumor types such as colon, gastric, pancreatic, and brain tumors [9, 37], and has also been associated with high tumor aggressiveness and poor patient prognosis [15, 38]. In cell studies, the growth rate of glioblastoma multiforme (GBM) cells correlated with the level of COX-2 enzyme expression, and PGE<sub>2</sub> is thought to inhibit these cells' apoptosis [39] and to act as a radioprotector [40, 41]. As GBM is a high-grade primary brain tumor that is refractory to current forms of treatment possibly due to the presence of tumor-derived CSC, such molecular and cellular attributes may therefore reflect the CSC therapy resistance phenotype. In light of our results showing increased expression of COX-2 in CD133(+) U87-derived glioma cells as well as in CD133-enriched U87 neurospheres, it could be hypothesized that this molecular signature may, in part, be responsible for the therapy resistance phenotype attributable to CSC.

Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP) constitute a growing subclass of MMP, with MT1-MMP being the best-characterized MT-MMP whose expression correlates with high-grade gliomas [19]. Aside from its well-established roles in the activation of proMMP-2 and its intrinsic proteolytic activity towards ECM molecules, many new functions of MT1-MMP have recently been demonstrated which include a role in PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis [23] as well as radioresistance in glioma cells [26, 27]. The recent demonstration that MT1-MMP also plays a role in medulloblastoma CD133(+) neurosphere-like formation and increased invasiveness [6] further supports the concept of a molecular interplay between MT1-MMP and COX-2. Besides glioblastoma cells, such a link has also been observed in cells derived from malignant fibrous histiocytoma, one of the highest-grade sarcomas arising in bone and soft tissue, where concomitant increased levels of expression of COX-2 and of MT1-MMP were described [42]. Overexpression of COX-2 was also found to elevate tumorigenicity, tumor growth and invasion of human KB carcinoma cells via up-regulated MT1-MMP activity [43]. Finally, co-distribution of MT1-MMP, MMP-2 and COX-2 was demonstrated in grade IV atheroma, again indicating a possible link between these

enzymes in the destabilization of atherosclerotic plaques [44]. Altogether, these published data suggest a molecular signaling convergence linking COX-2 to MT1-MMP expression.

By virtue of its ability to regulate the expression of genes involved in cell apoptosis, differentiation, adhesion, and survival, NF- $\kappa$ B constitutes the point of convergence of many oncogenic pathways [45]. Aside from its critical role in the development of human cancer, NF- $\kappa$ B has also been implicated at the molecular level in the promotion of angiogenesis, which is of particular interest since malignant astrocytomas are highly vascular tumors [46]. NF- $\kappa$ B is also a transcriptional regulator of inducible expression of genes including COX-2 [47]. Interestingly, a consensus binding site for NF- $\kappa$ B P65 (TGGAGCTTCC) was found in the 5'-flanking region of the human MT1-MMP gene [48] and NF- $\kappa$ B-mediated induction of MT1-MMP was confirmed in murine melanoma cells [49] and in human fibrosarcoma cells [50]. Further studies also implicated NF- $\kappa$ B as a potentially critical factor in astrocytic tumorigenesis and astrocytoma progression through analysis of cell lines and preclinical models [51-53]. NF- $\kappa$ B functions as a hetero- or homo-dimer which can be formed from five NF- $\kappa$ B subunits, NF- $\kappa$ B1 (P50 and its precursor p105), NF- $\kappa$ B2 (p52 and its precursor p100), RelA (P65), RelB and c-Rel. The most studied dimer, P50:P65, is activated by the classical pathway and usually promotes gene expression. In the current study, we provide evidence for a MT1-MMP-mediated signaling cascade that leads to activation of COX-2 expression that is independent of MT1-MMP's catalytic function (Fig.4). We also demonstrate that this new MT1-MMP/COX-2 signaling axis, in fact, absolutely requires NF- $\kappa$ B P50 while knockdown of NF- $\kappa$ B P65 still enabled MT1-MMP to trigger COX-2 expression. In support to our results, an increase in NF- $\kappa$ B P50 was recently found to rapidly induce MT1-MMP expression in trabecular meshwork cells [54]. Given MT1-MMP's well documented roles in actin/tubulin cytoskeleton perturbation associated to cell migration or tubulogenesis processes, very exciting and recent studies documented a new and underestimated role for dynein/dynactin complex in the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B [55]. Whether such microtubule involvement is affected by MT1-MMP and that would mediate specific P50 nuclear translocation certainly deserves further experimentation.



Among the therapeutic molecules that could be envisioned to target COX-2 functions in CSC, the radiosensitizing actions of meloxicam and celecoxib may be considered in light of their inhibition of PGE<sub>2</sub> production [18, 56]. Future experimental studies on the growth inhibitory and radiosensitizing effects of these two molecules should focus on PGE<sub>2</sub> synthesis and on apoptosis induction in CSC. In fact, our present findings that COX-2 induction correlates with CD133 expression in human glioma cell lines demonstrates that selective COX-2 inhibitors may thus yield a promising perspective to further improve the therapy of glioma patients. Therefore, the development of pharmaceutical approaches that alter expression of MT1-MMP or the MT1-MMP/COX-2 signaling axis in neuroinflammation provides new biological significance that prompts in targeting invading glioma cells.

**List of abbreviations**

COX, cyclooxygenase; CSC, cancer stem cells; ECM, extracellular matrix; MEF, mouse embryonic fibroblasts; MT1-MMP, membrane type-1 matrix metalloproteinase; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappaB

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests. None of the authors hold stocks or shares in any pharmaceutical company or hold or are applying for any patents relating to the contents of the manuscript.

**Acknowledgements**

BA holds a Canada Research Chair in Molecular Oncology from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). AS is a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) awardee. This study was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to BA, and by the CIHR and the Claude Bertrand Chair in Neurosurgery to RB.

## References

1. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer*. 2006, 5:67.
2. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI: Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100:15178-15183.
3. Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS: Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004, 23:9392-9400.
4. Blazek ER, Foutch JL, Maki G: Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007, 67:1-5.
5. Dean M, Fojo T, Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005, 5:275-284.
6. Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laflamme C, Lachambre MP, Rolland Y, Sartelet H, Béliveau R: Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype. *Mol Cancer Res*. 2008, 6:907-916.
7. Howard BM, Boockvar JA: Stem Cell Marker CD133 Expression Predicts Outcome in Glioma Patients. *Neurosurgery* 2008, 62:N8.
8. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008, 14:123-129.
9. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF: Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res*. 2001, 61:4375-4381.
10. Joki T, Heese O, Nikas DC, Bello L, Zhang J, Kraeft SK, Seyfried NT, Abe T, Chen LB, Carroll RS, Black PM: Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res*. 2000, 60:4926-4931.
11. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996, 271:33157-33160.
12. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000, 69:145-182.

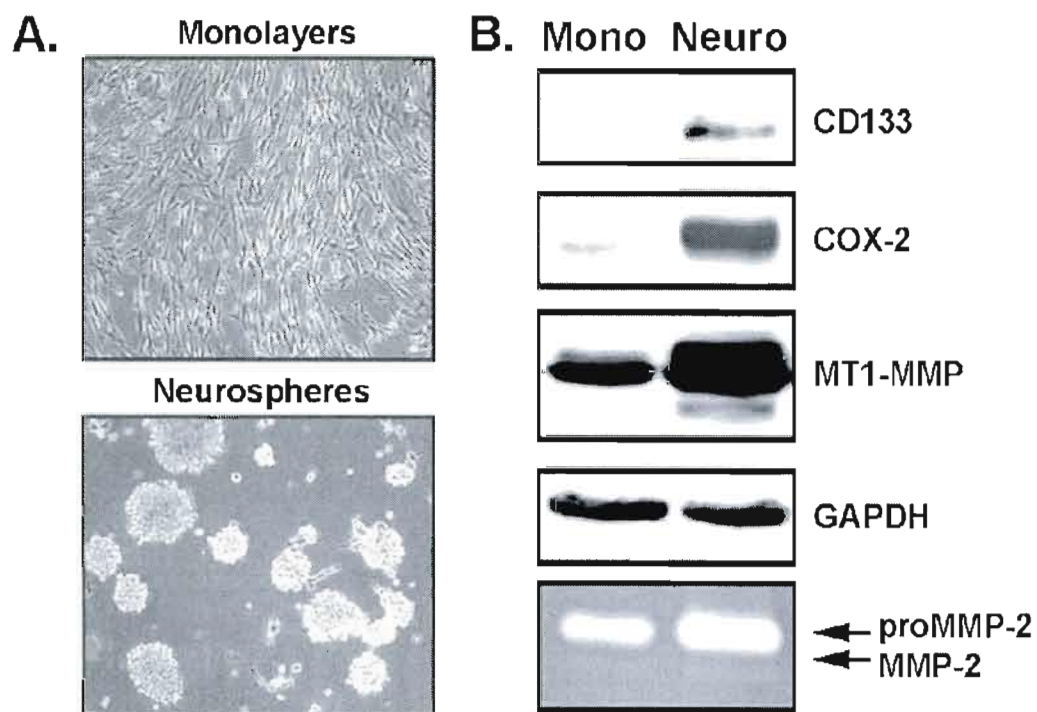
13. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Mittelbronn M, Meyermann R: Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol.* 1999, 98:240-244.
14. Wilson, D.E., Anderson, K.M., and Seed, T.M: Ultrastructural evidence for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitors of eicosanoid metabolism. *Neurosurgery* 1990, 27:523-531.
15. New P: Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. *Cancer Control* 2004, 11:152-164.
16. Sminia P, Stoter TR, van der Valk P, Elkhuisen PH, Tadema TM, Kuipers GK, Vandertop WP, Lafleur MV, Slotman BJ: Expression of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005, 131:653-661.
17. Kang KB, Wang TT, Woon CT, Cheah ES, Moore XL, Zhu C, Wong MC: Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007, 67:888-896.
18. Kuipers GK, Slotman BJ, Wedekind LE, Stoter TR, Berg J, Sminia P, Lafleur MV: Radiosensitization of human glioma cells by cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition: independent on COX-2 expression and dependent on the COX-2 inhibitor and sequence of administration. *Int J Radiat Biol.* 2007, 83:677-685.
19. Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC: The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol.* 2001, 53:187-202.
20. Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre MP, Annabi B, Béliveau R: Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett.* 2001, 507:231-236.
21. Annabi, B., Thibeault, S., Moumdjian, R., and Béliveau, R: Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *J Biol Chem.* 2004, 279:21888-21896.
22. Belkaid A, Fortier S, Cao J, Annabi B: Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia* 2007, 9:332-430.
23. Alfranca A, López-Oliva JM, Genís L, López-Maderuelo D, Mirones I, Salvado D, Quesada AJ, Arroyo AG, Redondo JM: PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-

- mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood* 2008, 112:1120-1128.
24. Fortier S, Labelle D, Sina A, Moreau R, Annabi B: Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett.* 2008, 582:799-804.
  25. Fortier S, Touaibia M, Lord-Dufour S, Galipeau J, Roy R, Annabi B: Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Glycobiology* 2008, 18:195-204.
  26. Wild-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W: Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 2001, 61:2744-2750.
  27. Wick W, Wick A, Schulz JB, Dichgans J, Rodemann HP, Weller M: Prevention of irradiation-induced glioma cell invasion by temozolomide involves caspase 3 activity and cleavage of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 2002, 62:1915-1919.
  28. Annabi B, Lee YT, Martel C, Pilorget A, Bahary JP, Béliveau R: Radiation induced-tubulogenesis in endothelial cells is antagonized by the antiangiogenic properties of green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Biol Ther.* 2003, 2:642-649.
  29. Rietze RL, Reynolds BA: Neural stem cell isolation and characterization. *Methods Enzymol.* 2006, 419:3-23.
  30. Rodgers SE, Connolly JL, Chappell JD, Dermody TS: Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a sigma1-null mutant. *J Virol.* 1998, 72:8597-8604.
  31. Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C: Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, 24:1892-1903.
  32. Milosevic J, Storch A, Schwarz J: Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres. *Exp Cell Res.* 2004, 294:9-17.
  33. Gal H, Makovitzki A, Amariglio N, Rechavi G, Ram Z, Givol D: A rapid assay for drug sensitivity of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007, 358:908-913.
  34. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP: CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007, 67:4010-4015.

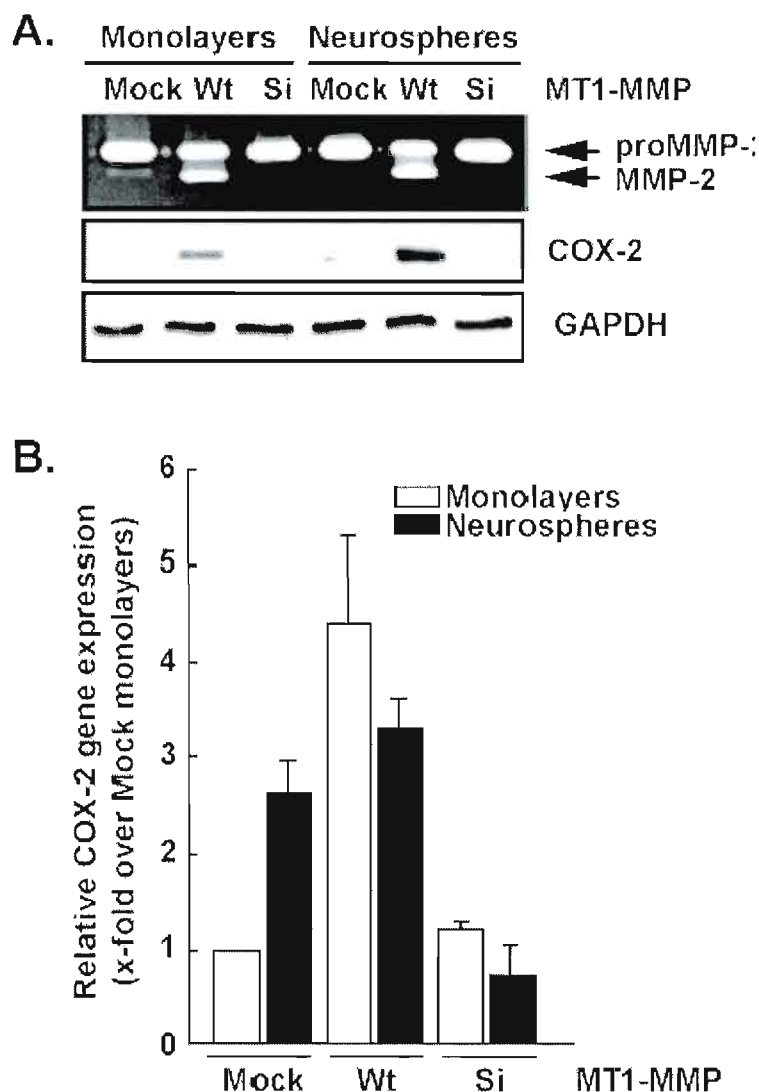
35. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004, 432:396-401.
36. Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN: Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006, 38:1654-1661.
37. Choy H, Milas L: Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95:1440-1452.
38. Khuri FR, Wu H, Lee JJ, Kemp BL, Lotan R, Lippman SM, Feng L, Hong WK, Xu XC: Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2001, 7:861-867.
39. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K: Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res.* 1999, 59:198-204.
40. Hanson WR, DeLaurentiis K: Comparison of in vivo murine intestinal radiation protection by E-prostaglandins. *Prostaglandins* 1987, 33:93-104.
41. Zaffaroni N, Villa R, Orlandi L, De PA, Del MS, Silvestrini R: Differential effect of 9 beta-chloro-16, 16-dimethyl prostaglandin E2 (nocloprost) on the radiation response of human normal fibroblasts and colon adenocarcinoma cells. *Radiat Res.* 1993, 135:88-92.
42. Maeda T, Hashitani S, Zushi Y, Segawa E, Tanaka N, Sakurai K, Urade M: Establishment of a nude mouse transplantable model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008, 134:1005-1011.
43. Takaoka K, Kishimoto H, Segawa E, Hashitani S, Zushi Y, Noguchi K, Sakurai K, Urade M: Elevated cell migration, invasion and tumorigenicity in human KB carcinoma cells transfected with COX-2 cDNA. *Int J Oncol.* 2006, 29:1095-1101.
44. Kuge Y, Takai N, Ishino S, Temma T, Shiomi M, Saji H: Distribution profiles of membrane Type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis. *Biol Pharm Bull.* 2007, 30:1634-1640.
45. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X: NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005, 446:475-482.
46. Korkolopoulou P, Levidou G, Saetta AA, El-Habr E, Eftichiadis C, Demenagas P, Thymara I, Xiromeritis K, Boviatsis E, Thomas-Tsagli E, Panayotidis I, Patsouris E: Expression of nuclear factor-kappaB in human astrocytomas: relation to p1 kappa Ba, vascular endothelial growth factor, Cox-2, microvascular characteristics, and survival. *Hum Pathol.* 2008, 39:1143-1152.



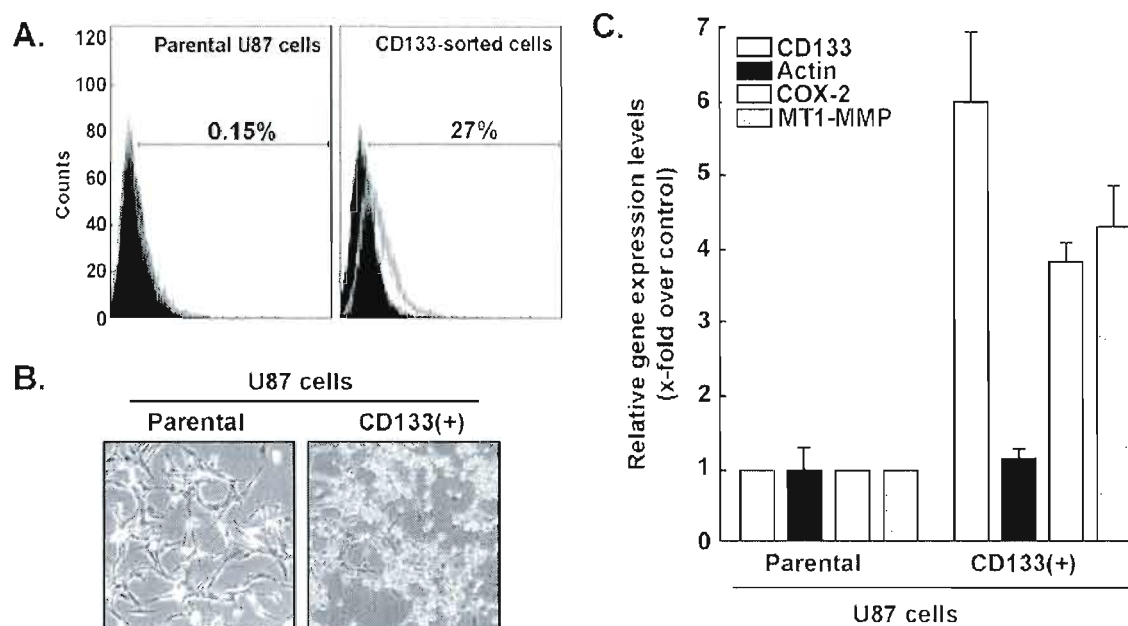
47. Lim JW, Kim H, Kim KH: NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection. *Free Radic Biol Med.* 2001, 31:355-366.
48. Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL: TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci.* 2001, 114:131-139.
49. Philip S, Bulbule A, Kundu GC: Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem.* 2001, 276:44926-44935.
50. Park JM, Kim A, Oh JH, Chung AS: Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation. *Carcinogenesis* 2007, 28:837-847.
51. Nagai S, Washiyama K, Kurimoto M, Takaku A, Endo S, Kumanishi T: Aberrant nuclear factor-kappaB activity and its participation in the growth of human malignant astrocytoma. *J Neurosurg.* 2002, 96:909-917.
52. Hayashi S, Yamamoto M, Ueno Y, Ikeda K, Ohshima K, Soma G, Fukushima T: Expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1, and c-Myc in human astrocytomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2001, 41:187-195.
53. Yamamoto M, Fukushima T, Hayashi S, Ikeda K, Tsugu H, Kimura H, Soma G, Tomonaga M: Correlation of the expression of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR 1) and c-Myc with the clinical course in the treatment of malignant astrocytomas with recombinant mutant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-SAM2). *Anticancer Res* 2000, 20:611-618.
54. Miller AM, Nolan MJ, Choi J, Koga T, Shen X, Yue BY, Knepper PA: Lactate treatment causes NF-kappaB activation and CD44 shedding in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007, 48:1615-1621.
55. Shrum CK, Defrancisco D, Meffert MK: Stimulated nuclear translocation of NF-kappaB and shuttling differentially depend on dynein and the dynactin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:2647-2652.
56. Bijnsdorp IV, van den Berg J, Kuipers GK, Wedekind LE, Slotman BJ, van Rijn J, Lafleur MV, Sminia P: Radiosensitizing potential of the selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor meloxicam on human glioma cells. *J Neurooncol.* 2007, 85:25-31.



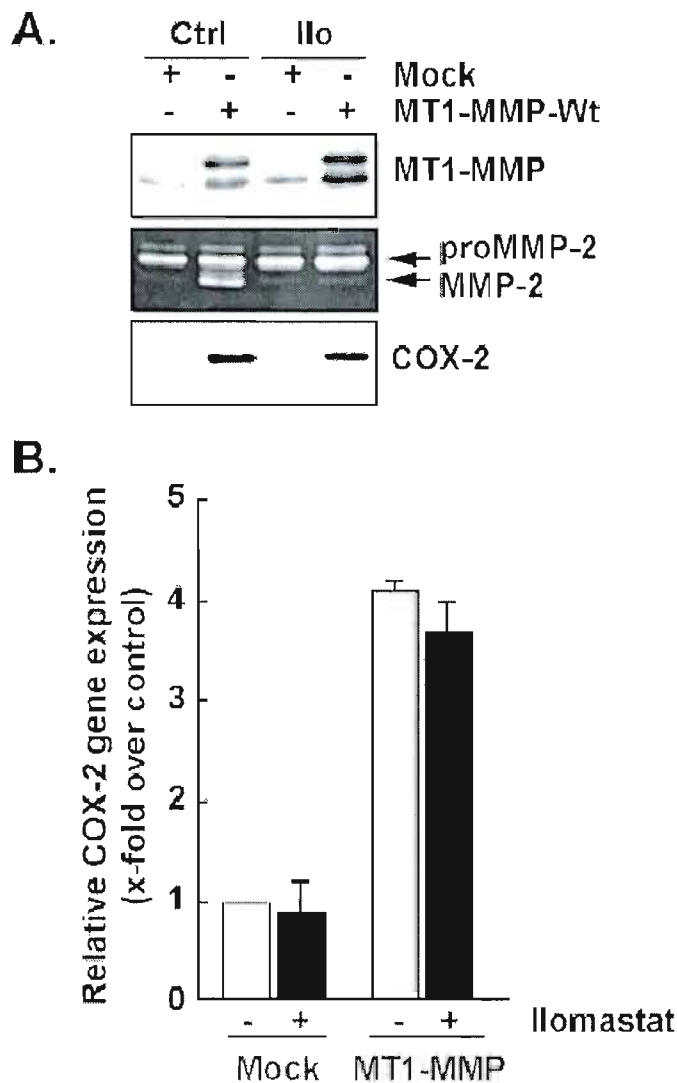
**Figure 1: CD133, COX-2 and MT1-MMP expression are increased in U87 neurospheres glioma cultures.** (A) U87 glioblastoma-derived cell lines were cultured as monolayers or non-adherent neurospheres as described in Methods section and representative phase contrast photographs were taken. (B) Cell lysates were isolated from U87 glioblastoma-derived cells and SDS-PAGE performed (20 $\mu$ g protein/well), followed by Western blotting and CD133, COX-2, MT1-MMP or GAPDH immunodetection. Gelatin zymography was also used to monitor the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells.



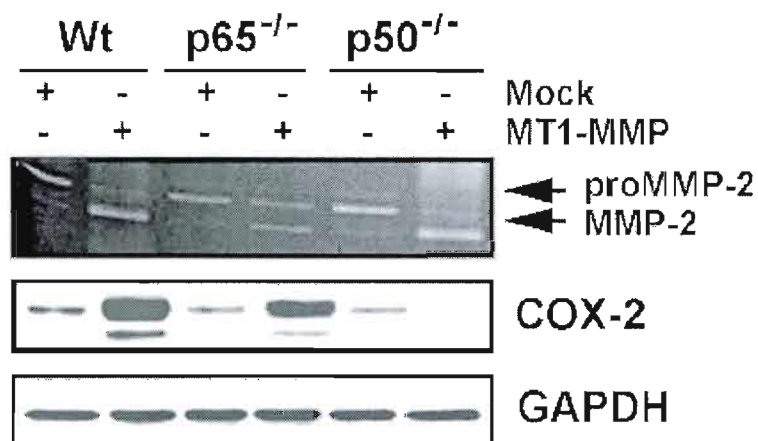
**Figure 2 : Cell-based evidence that MT1-MMP directly regulates COX-2 expression in U87 glioma cell lines.** Monolayers or neurospheres from glioblastoma-derived cells were either Mock-transfected, transfected with siRNA (Si) against MT1-MMP as described in Methods section. (A) Gelatin zymography was performed to monitor the extent of latent proMPP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells. Cell lysates were isolated from U87 glioblastoma-derived cells and SDS-PAGE performed (20µg protein/well), followed by Western-blotting and COX-2 or GAPDH immunodetection. (B) Total RNA was isolated from monolayer (white bars) or neurospheres (black bars) of U87 Mock-transfected cells, or from U87 cells transfected with MT1-MMP, and reverse-transcribed as described in the Methods section. Quantitative PCR was performed in order to monitor COX-2 gene expression levels.



**Figure 3 : CD133-sorted U87 glioma cells grow as neurospheres and express high levels of COX-2.** (A) U87 CD133(+) cells isolated from the parental U87 cells as described in the Methods section using MACS technology. Evaluation of CD133 cell surface expression was then performed by flow cytometry on parental U87 and CD133(+) sorted cells. (B) U87 CD133(+) cells were put back into culture and show a typical neurosphere phenotype, unlike their parental counterpart. (C) Total RNA was extracted from parental U87 and CD133(+) U87 cells and gene expression levels were assessed by qRT-PCR for CD133 (white bars).  $\beta$ -actin (black bars). MT1-MMP (lined bars) and COX-2 (grey bars).



**Figure 4: MT1-MMP-mediated regulation of COX-2 gene and protein expression is independent from MT1-MMP's catalytic functions.** (A) Cell lysates were isolated from Mock-transfected, or U87 glioma cells that had been transiently transfected with a cDNA plasmid encoding MT1-MMP, which were subsequently treated (or not) with 10 $\mu$ M Ilomastat (Ilo). SDS-PAGE was performed (20  $\mu$ g protein/well), followed by Western-blotting and COX-2 or MT1-MMP immunodetection. Gelatin zymography was also used to monitor the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells. (B) Total RNA was extracted from the above described cell conditions and gene expression levels assessed by qRT-PCR for COX-2 in the absence (white bars) or the presence of Ilomastat (black bars).



**Figure 5: COX-2 induction by MT1-MMP occurs through NF- $\kappa$ B-mediated mechanisms.** Wild-type (Wt), P65<sup>-/-</sup>, and P50<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEF) were Mock-transfected or transfected with a cDNA plasmid encoding MT1-MMP. Gelatin zymography was used to monitor the extent of latent proMMP-2 and active MMP-2 expression from the conditioned media of the serum-starved cells (upper panel). Cell lysates were isolated and SDS-PAGE performed (20 $\mu$ g protein/well), followed by Western blotting and COX-2 immunodetection.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la résistance des cellules CD133(+) face aux traitements anti-cancers actuels nous permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Nos recherches lèvent le voile sur un axe de signalisation encore méconnu, soit la transduction de signaux initiés par le domaine cytoplasmique de MT1-MMP menant à l'induction de l'expression de COX-2 via la voie NF- $\kappa$ B (Figure 11). Cette signalisation semble prédominante chez les cellules CD133(+) de glioblastome vu leur haut niveau basal de MT1-MMP et de COX-2 comparativement à la population tumorale parentale. L'axe MT1-MMP/COX-2 influencerait chacune des six signatures du cancer ce qui implique que les CSC CD133(+) seraient garantes de l'initiation tumorale, de la progression des cancers et de l'invasion tissulaire subséquente. Notre découverte propose que le ciblage thérapeutique de COX-2, NF- $\kappa$ B ou de MT1-MMP permettrait d'antagoniser certaines fonctions des CSC.

#### **Rôles de COX-2 dans la résistance des tumeurs aux traitements de chimio et de radiothérapie**

##### *Sensibilisation des tumeurs aux traitements cytotoxiques par l'inhibition de COX-2*

Plusieurs évidences moléculaires soulignent le rôle pivot de la surexpression de COX-2 dans la résistance des cellules tumorales à la radiothérapie, l'un des traitements principaux des GBM. À la lumière des rôles de COX-2 dans la carcinogénèse, des études cliniques ont testé l'ajout d'un inhibiteur de COX-2 à la radiothérapie afin d'accroître l'efficacité des radiations sur l'induction de la mort cellulaire. Une augmentation de la radiosensibilité par des inhibiteurs de COX-2 est évidente dans plusieurs variétés de tumeurs. D'abord, *in vitro*, des inhibiteurs spécifiques de COX-2 augmentent la mort des cellules tumorales induite par la radiothérapie dans les cellules issues de tumeurs mammaires murines (Lanza-Jacoby et al., 2004), des carcinomes (Amirghahari et al., 2003), des tumeurs pulmonaires (Pyo et al., 2001), des fibrosarcomes (Raju et al., 2002) et des GBM (Petersen et al., 2000). Des études *in vivo* ont aussi été développées pour mesurer l'efficacité d'une telle combinaison et des résultats similaires aux études *in vitro* ont été observés. Les tumeurs

développées dans des modèles animaux à partir de cellules cancéreuses de carcinome du poumon (Liu et al., 2003), carcinome du colon (Davis et al., 2004), de sarcome (Kishi et al., 2000) et de cellules U87 de GBM (Kang et al., 2007) reflètent une diminution prononcée du taux de croissance tumorale en combinant la radiothérapie avec un inhibiteur de COX-2 comparativement à des radiations seules. Ces différentes observations supportent l'investigation d'inhibiteurs de COX-2 en clinique pour le traitement de gliomes malins. Une première étude pilote combinant l'agent de chimiothérapie, le temozolomide, à un inhibiteur spécifique de COX-2, le rofecoxib, a montré d'abord la sécurité et la faisabilité de cette combinaison chez des patients atteints de GBM. L'étude montre que cette combinaison ne diminue pas la qualité de vie des patients. Les résultats indiquent même que la combinaison de temozolomide et du rofecoxib offre une activité anti-angiogénique et anti-proliférative supérieure au temozolomide seul, donc attribuable à l'inhibiteur spécifique de COX-2 (Tuettenberg et al., 2005).

Nos résultats suggèrent que l'inhibition de COX-2 peut se faire directement en ciblant COX-2 ou indirectement en ciblant les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B, précisément en empêchant la translocation de la sous-unité P50. Différents arguments convergent vers le ciblage de NF- $\kappa$ B en clinique à des fins de thérapie contre le cancer. En effet, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est impliqué dans la majorité des étapes de la carcinogénèse en plus de son rôle dans l'induction d'une résistance à la radiothérapie. En effet, les radiations augmentent fortement l'activité de NF- $\kappa$ B, dont la transcription de COX-2, dans des lignées cancéreuses de thyroïde (Starenki et al., 2004), de fibrosarcomes (Wang et al., 1999) et de glioblastomes (Weaver et al., 2003). Quelques approches sont suggérées dans la littérature pour cibler NF- $\kappa$ B. D'abord, l'inhibition de NF- $\kappa$ B peut se faire à l'aide de peptides perméables à la membrane plasmique qui inhibent la translocation de NF- $\kappa$ B. De cette façon, le traitement de cellules cancéreuses avec l'un de ces peptides, le (SN50), inhibe l'activité de NF- $\kappa$ B basale et induite par les radiations et induit fortement la mort cellulaire *in vitro* en combinaison avec une exposition aux radiations dans des cellules de cancéreuses de la thyroïde (Starenki et al., 2004) et de fibrosarcome (Wang et al., 1999). La translocation de NF- $\kappa$ B peut aussi être inhibée. En effet, le déhydroxyméthyle-poxyquinomicin (DHMEQ) inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF, soit l'inducteur principal de la voie NF- $\kappa$ B (Ariga et al., 2002). Cette drogue promeut l'apoptose dans différents types de cellules cancéreuses et



s'est vue efficace contre le cancer de la vessie (Horiguchi et al., 2003) et contre le cancer de la prostate (Kikuchi et al., 2003) dans des modèles *in vivo* sans effets toxiques apparents. De plus, dans les GBM, un inhibiteur des kinases IKK, le sulfasalazine, empêche la phosphorylation et la dégradation subséquente de l'inhibiteur IKB via les IKK. Le sulfasalazine inhibe donc la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et supprime la croissance des GBM dans un modèle *in vivo* de tumeur cérébrale (Robe et al., 2004).

L'inhibition de COX-2 et de NF $\kappa$ B sensibilise les cellules cancéreuses aux traitements cytotoxiques. Bien que ces protéines aient des rôles oncogéniques précis, les mécanismes de la sensibilisation des cellules cancéreuses à la radiothérapie par ces inhibiteurs doivent être élucidés.

*Cibler COX-2 dans les CSC CD133(+) afin de déstabiliser la niche vasculaire*

Une explication possible de l'inhibition de la croissance cellulaire et de la dégénérescence des tumeurs via l'inhibition direct ou indirect de COX-2, en combinaison avec un traitement cytotoxique, pourrait faire intervenir le ciblage des CSC CD133(+). Selon le modèle des CSC, une tumeur ne peut pas se régénérer si les CSC en viennent à se différencier ou à mourir. Les CSC maintiennent leurs propriétés de cellules souches dans une niche vasculaire tumorale (Calabrese et al., 2007). Cibler les CSC en déstabilisant différents paramètres de leur microenvironnement peut perturber l'auto-renouvellement des CSC et mener possiblement à leur différenciation.

Cibler la niche vasculaire à l'aide d'un traitement anti-angiogénique pourrait être la clé pour une thérapie efficace contre le cancer. Par exemple, un traitement anti-angiogénique à l'aide d'un inhibiteur spécifique au VEGF, le Bevacizumab, affaiblit les vaisseaux sanguins tumoraux et mène à une réduction dramatique du nombre de CSC CD133(+) dans un modèle murin de tumeurs orthotopiques de glioblastome. (Calabrese et al., 2007) (Figure 12).

Les CSC CD133(+) contribuent au maintien de la niche vasculaire. Les protéines COX-2, NF- $\kappa$ B et MT1-MMP sont surexprimées dans les CSC CD133(+). Ces protéines régulent à la hausse les facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF ou augmentent leur disponibilité ce qui stimule l'angiogenèse tumorale. De plus, l'expression de

COX-2 et de PGE2 tout comme l'expression de NF- $\kappa$ B par les CSC soutiennent la survie des CSC en condition hypoxique. Donc, l'inhibition de l'axe MT1-MMP/COX-2 via un inhibiteur de COX-2 ou de NF- $\kappa$ B pourrait mener à la perturbation de la niche vasculaire des CSC. La niche vasculaire est déstabilisée et les CSC, privées des conditions favorables leur permettant de se renouveler, se différencient. Les CSC différenciées ne peuvent plus maintenir la croissance de la tumeur et cette dernière finit par dégénérer. Ces convergences d'évènements via l'inhibition de COX-2 dans les CSC reflèteraient les bons résultats *in vitro* et *in vivo* observés à l'aide d'inhibiteur de COX-2.

### **Nouveau rôle du domaine cytoplasmique de MT1-MMP dans la signalisation d'un axe MT1-MMP/COX-2**

L'implication de MT1-MMP dans le phénotype invasif des GBM est connue depuis plusieurs années (Fillmore, VanMeter et Broaddus, 2001). Nous avons montré récemment que le phénotype invasif des GBM est en partie dû aux cellules CD133(+) et que MT1-MMP en est la protéine clé (Annabi et al., 2008). Nous montrons dans notre étude que les cellules CD133(+) surexpriment MT1-MMP et qu'elle est impliquée dans un axe de signalisation menant à l'expression de COX-2, une protéine impliquée dans la résistance aux traitements. Le ciblage de la MT1-MMP qui est en amont de l'axe de signalisation MT1-MMP/COX-2 suggère un potentiel thérapeutique élevé. Bien que la MT1-MMP soit impliquée dans l'invasion tumorale et dans les processus de métastase via l'activation de la pro-MMP2 et de par ses activités protéolytiques, l'inhibition de son expression résulterait d'abord en une diminution de la motilité des cellules cancéreuses mais aussi, selon nos résultats, en l'inhibition de la protéine COX-2. Afin d'observer une inhibition de la transduction des signaux intracellulaires initiée par MT1-MMP qui est d'ailleurs indépendante de sa partie catalytique, le traitement devrait soit induire le recyclage de MT1-MMP via un anticorps qui lui est spécifique, soit inhiber l'expression protéique de MT1-MMP par un ARN interférant ou soit entrer en compétition avec la région cytoplasmique de MT1-MMP à l'aide de molécule qui mime la structure de ce domaine.

### *Échec des inhibiteurs des MMPs comme traitement contre le cancer*

Des inhibiteurs de MMPs à large spectre (MMPi) ne réussissent pas à inhiber la prolifération cellulaire ou les processus métastatiques lors d'essais cliniques. Ces MMPi ciblent l'activité catalytique des MMPs. Souvent, ces MMPi ont une structure qui imite celle du collagène. Ces molécules sont des chélateurs du zinc présent au site actif des MMPs et peuvent compétitionner pour les substrats naturels (Hidalgo et Eckhardt, 2001). Bien que plusieurs MMPi puissent inhiber *in vitro* la migration cellulaire et la tubulogenèse (Eccles et al., 1996; Sawaya et al., 1996; Naglich et al., 2001), ces MMPi n'ont pas réussi à montrer un bénéfice thérapeutique lorsque combinés avec des agents de chimiothérapie lors de plusieurs études cliniques (Bramhall et al., 2001; Bramhall et al., 2002; Sparano et al., 2004). D'ailleurs, certaines études cliniques observent que l'administration de MMPi est associée avec un risque augmenté de la progression du cancer et de la mort (Gunzburg, Lohr et Salmons, 2002; Moore et al., 2003). La base des mécanismes anti-migratoires des MMPi lors d'études *in vitro* semble provenir de leurs capacités à inhiber la dégradation de la MEC (Macaulay et al., 1999; Wylie et al., 1999).

L'échec des MMPi en essais cliniques pourrait être expliqué par la capacité des MT-MMP, dont la MT1-MMP, à initier certaines signalisations cellulaires impliquées dans la modulation du cytosquelette (Itoh, 2006), l'activation de la voie de ERK (Gingras et al., 2001) ou dans la surexpression de COX-2. De plus, l'échec des MMPi pourrait provenir de la pauvre sélectivité de ces molécules. Il est maintenant reconnu que parmi les membres de la famille des MMPs, certains possèdent des activités promotrices du cancer alors que d'autres possèdent des fonctions inhibitrices tumorales (Egeblad et Werb, 2002), soulignant le risque d'utiliser des MMPi à large spectre. Vu l'étendue des activités biologiques influencées par les MMPs dans différents tissus et organes du corps humain, il semble que davantage de recherche soit nécessaire pour développer des thérapies efficaces qui ciblent davantage les MMPs ayant un impact certain dans la carcinogénèse.

### *Caractérisation de la région cytoplasmique de MT1-MMP comme cible thérapeutique*

La résistance des GBM aux traitements actuels vient d'une part de la capacité des cellules cancéreuses qui survivent à ces traitements à infiltrer les tissus sains adjacents et à

réinitier une tumeur. Nous croyons que ces cellules soient les CSC CD133(+). Notre groupe a déjà montré que la protéine MT1-MMP est l'une des responsables du potentiel invasif des CSC CD133(+). Donc l'inhibition spécifique de l'expression de MT1-MMP ou de sa région cytosolique indique un potentiel thérapeutique prometteur. En effet, selon l'axe MT1-MMP/COX-2 que nous observons, l'inhibition spécifique de la portion intracellulaire de MT1-MMP résulterait en l'inhibition de l'expression de COX-2 dont les effets thérapeutiques ont déjà été discutés.

L'expression de la MT1-MMP *in vivo* mène à des changements morphologiques cellulaires propres à la promotion de l'invasion (Hotary et al., 2006). Ces changements suggèrent des modifications dans la transduction de signaux et de voies de transcription que MT1-MMP peut en effet affecter directement ou indirectement. En effet, MT1-MMP peut promouvoir la transduction de signaux intracellulaires via la phosphorylation de son domaine cytoplasmique. L'unique résidu tyrosine (Tyr<sup>573</sup>) de la région cytoplasmique de MT1-MMP est phosphorylé par une tyrosine kinase, la kinase Src (Nyalendo et al., 2007). Une mutation de la Tyr<sup>573</sup> empêche le recrutement de Src et la phosphorylation subséquente de la région cytoplasmique de MT1-MMP (Nyalendo et al., 2007). La transfection d'une forme recombinante de ce mutant dans des cellules U87 ne stimule pas la migration cellulaire contrairement à la forme sauvage de MT1-MMP (Nyalendo et al., 2007).

La transduction des signaux intracellulaires via MT1-MMP pourrait impliquer la phosphorylation du résidu tyrosine de la région cytoplasmique. Dans notre étude, nous montrons que le domaine cytoplasmique de MT1-MMP est responsable de la transduction des signaux menant vers l'expression protéique de COX-2. Différentes évidences dans la littérature tendent à montrer un lien entre Src et COX-2. En effet, l'acide lysophosphatidique (LPA) est un phospholipide bioactif impliqué dans plusieurs événements cellulaires incluant la migration cellulaire. Le LPA induit l'expression de COX-2 de façon dose-dépendante et l'inhibition de Src via un inhibiteur pharmacologique ou un ARN interférent ne permet plus l'expression de COX-2 via le LPA (Jeong et al., 2008). Une autre étude a montré que la thrombine, qui est une molécule de signalisation influençant l'agrégation plaquettaire et la perméabilité vasculaire (Baykal, Schmedtje et Runge, 1995), régule l'activité de COX-2 (Syeda et al., 2006). Il a été démontré que cette régulation de COX-2 provient de la

transactivation des récepteurs à l'EGF dépendant de leur phosphorylation via Src (Hsieh et al., 2008). En effet, un inhibiteur de Src ne permet plus l'expression de COX-2 via la thrombine (Hsieh et al., 2008). De plus, cette induction de COX-2 est dépendante de la voie NF- $\kappa$ B qui intervient en amont de la phosphorylation des récepteurs (Hsieh et al., 2008). Donc, la phosphorylation de MT1-MMP via Src pourrait être un événement déclencheur de la transduction des signaux vers NF- $\kappa$ B puis vers l'expression de COX-2. Il serait intéressant d'étudier l'inhibition de Src dans les CSC CD133(+) surexprimant MT1-MMP et voir l'effet sur l'expression de COX-2.

La transduction des signaux via la région cytoplasmique de MT1-MMP révèle une nouvelle voie d'inhibition à des fins thérapeutiques. En effet, un inhibiteur de MT1-MMP pourrait cibler son domaine intracellulaire. Bien que MT1-MMP ait des rôles importants dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse ce qui rend cette protéine intéressante à cibler, la participation de cette enzyme dans la morphogenèse tissulaire suggère qu'une inhibition de son activité catalytique puisse générer des effets secondaires sévères (Overall et Kleifeld, 2006). Cependant, les signaux intracellulaires menant vers l'expression de COX-2 sont tout à fait indépendants du domaine catalytique de MT1-MMP tel que démontré à l'aide de la molécule Ilomastat. En ce sens, une stratégie d'inhibition de la progression tumorale pourrait venir de l'interférence de la voie de signalisation du domaine intracellulaire de MT1-MMP. La synthèse de la portion cytoplasmique encodant la Tyr<sup>573</sup> pourrait se révéler une stratégie intéressante. Cette molécule pourrait entrer en compétition avec la région cytoplasmique de MT1-MMP et empêcher la signalisation subséquente.

#### *Nouveau rôle pour la sous-unité P50 de NF- $\kappa$ B*

Nos résultats suggèrent que la sous-unité P50 de NF- $\kappa$ B, et non la sous-unité P65, serait un joueur important de l'activité transcriptionnelle dans les tumeurs cérébrales. En effet, la surexpression de MT1-MMP dans des cellules P65<sup>-/-</sup> permet la transduction des signaux vers l'expression protéique de COX-2 contrairement aux cellules P50<sup>-/-</sup>. Un fait intéressant qui concorde avec nos résultats vient d'études sur les GBM. Deux groupes ont en effet trouvé que toutes les tumeurs humaines de type GBM montrent une immunoréactivité positive pour la protéine P50, alors que seule une faible proportion est positive pour la sous-unité P65 (Ansari et al., 2001; Robe et al., 2004). Ces observations, en plus des nôtres,

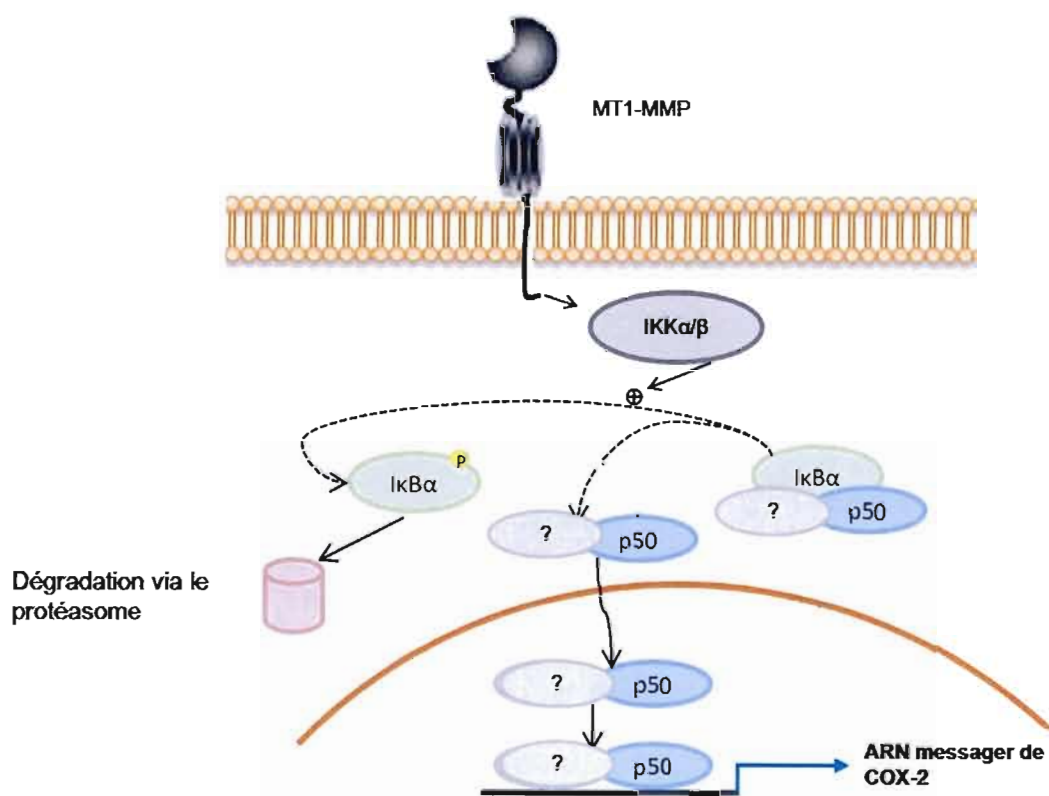
suggèrent que dans les cellules cancéreuses du cerveau, la signalisation de NF- $\kappa$ B n'est pas majoritairement due au complexe hétérodimérique P50:P65 qui est la forme active la plus commune. Comme l'homodimérisation de la sous-unité P50, qui ne contient pas le domaine Rel, mène à la répression de la transcription, cette sous-unité doit interagir avec un autre partenaire que P65 dans les tumeurs issues de GBM. Des indices viendraient d'une étude récente montrant que l'hétérodimère P65:P50 et c-Rel:P50 n'active pas les mêmes gènes dans le cerveau. En effet, le complexe cRel:P50, et non le complexe P65:P50, serait responsable de la transcription des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-xL et pro-survie tels que Bcl-2 (Sarnico et al., 2009). Le rôle de la sous-unité c-Rel n'a pas été investigué lors de nos études mais il serait possible, selon ces observations, que des cellules c-Rel<sup>-/-</sup> inhibent l'expression de COX-2 via MT1-MMP. Si c'était le cas, le ciblage spécifique de la protéine c-Rel permettrait une inhibition plus ciblée de la voie NF- $\kappa$ B et de l'expression de COX-2. L'inhibition à large spectre de l'activité de NF- $\kappa$ B nuit à plusieurs phénomènes physiologiques normaux et résulte en des effets secondaires nuisibles.

### **Cibler les CSC à l'aide de composés phytochimiques**

Bien que des composés synthétiques puissent cibler COX-2, NF- $\kappa$ B ou MT1-MMP, il serait possible de cibler les CSC à l'aide de molécules à propriétés anti-cancéreuses et d'origine naturelle. Les composés phytochimiques produits par les fruits, légumes et grains possèdent des propriétés anti-cancers et anti-inflammatoires. Ces composés naturels représentent une approche thérapeutique prometteuse pour la prévention et possiblement le traitement de plusieurs types de cancers. La capacité des composés phytochimiques d'inhiber la formation tumorale *in vitro* et *in vivo* est bien documentée (Ichikawa et al., 2007). Plusieurs de ces composés ont des effets antioxydants, anti-prolifératifs et pro-apoptotiques sur plusieurs variétés de cancer dont ceux du cerveau (Karmakar, Banik et Ray, 2007). L'avantage de ces composés est leur tolérance par le corps humain et qu'ils soient retrouvés dans différents produits naturels pouvant être ajoutés à la diète d'un patient. Plusieurs composés phytochimiques exercent leur activité anti-inflammatoire via l'inhibition de NF- $\kappa$ B. De ces composés figurent l'épigallocatechine (EGC) et l'épigallocatechine gallate (EGCg) (Kim et al., 2007) et le sulforaphane (Kim et al., 2005). Nous avons traité la population parentale de U87 ainsi que la population de CSC CD133(+) enrichie avec l'EGC,

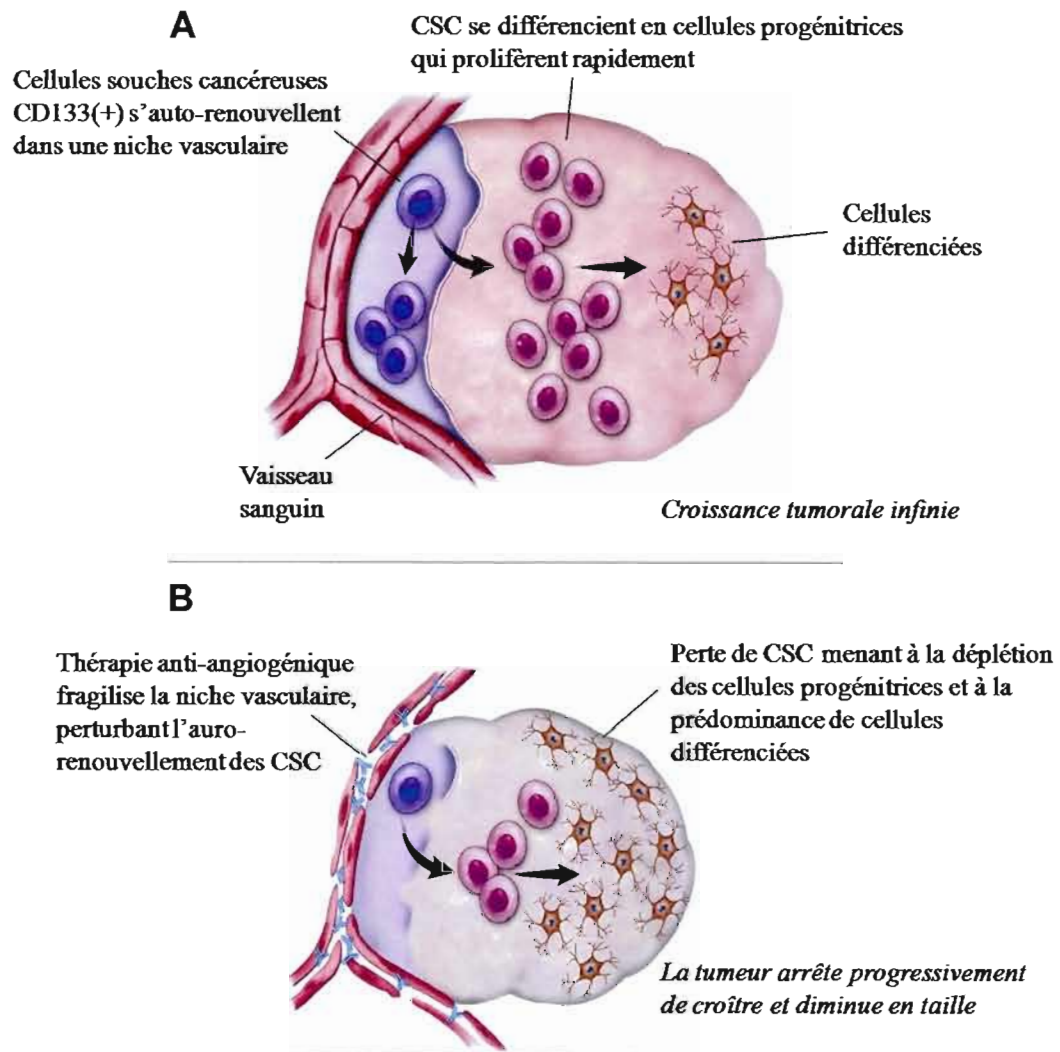
l'EGCg et le Sulforaphane et avons observé l'induction de l'apoptose en mesurant l'activité de la caspase-3, soit une protéine clé de la réponse apoptotique. Des résultats préliminaires nous indiquent que la population CD133(+) est aussi sensible que la population tumorale générale à l'EGCg et au sulforaphane nous indiquant le potentiel préventif et thérapeutique des composés phytochimiques (Figure 13).



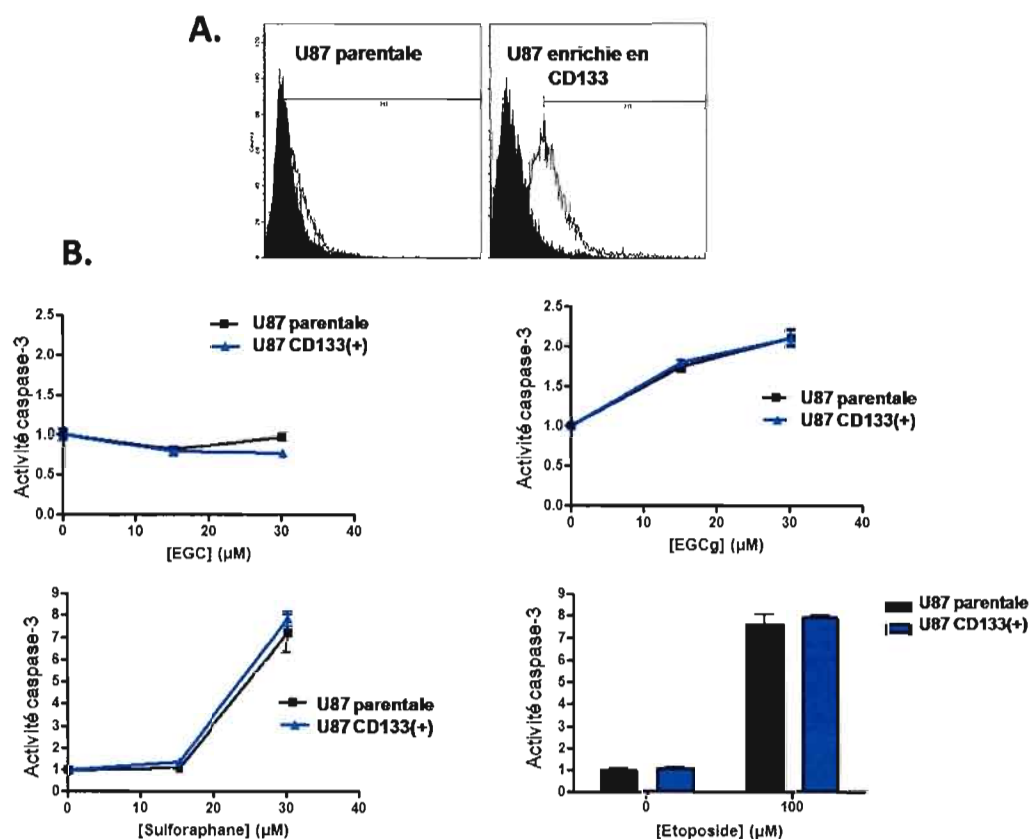


**Figure 11 : Axe MT1-MMP/COX-2 tel que proposé selon nos recherches.** La protéine MT1-MMP membranaire est responsable de la transduction des signaux via sa région cytoplasmique et indépendamment de son domaine extracellulaire. Afin que les signaux intracellulaires puissent induire l'expression de COX-2, la voie NF-κB fait le pont entre MT1-MMP et COX-2. La sous-unité p50 du facteur de transcription NF-κB est essentielle dans cette transduction des signaux. (? : membre de la famille de NF-κB ayant un domaine Rel)





**Figure 12 : Schématisation du rôle de la niche vasculaire et de son ciblage.** A) Les CSC résident près des vaisseaux sanguins lui permettant de s'auto-renouveler et de générer des cellules progénitrices. Les cellules progénitrices prolifèrent rapidement et se différencient. B) Une approche anti-angiogénique cible les vaisseaux sanguins menant à la désintégration de la niche vasculaire. Sans cette niche, les CSC ne peuvent plus s'auto-renouveler et se différencier. Avec la perte des CSC, la tumeur régresse et arrête de croître. (Yang et Wechsler-Reya, 2007)



**Figure 13 : Ciblage des CSC CD133(+) à l'aide de composés phytochimiques.** A) Les U87 CD133(+) ont été isolées des U87 parentales à l'aide de la technique du MACs. L'évaluation de l'expression à la surface de CD133 a été faite par cytométrie en flux sur les cellules U87 parentales et isolées CD133(+). B) Traitement des U87 parentales ou CD133 enrichies avec des composés phytochimiques soient l'épigallocatechine (EGC), l'épigallocatechine gallate (EGCg) et le sulforaphane. L'étoposide est un agent de chimiothérapie utilisée comme contrôle positif. Le dosage de l'activité de la caspase-3, un indice de la mort cellulaire, a été effectué après 18 heures de traitement.

## CONCLUSION

Nous avons démontré que la population de CSC CD133(+) dérivée d'une lignée de glioblastome surexprime les protéines COX-2 et MT1-MMP. De plus, nous avons découvert que la surexpression de MT1-MMP mène à l'induction de l'expression protéique de COX-2 et que cette signalisation requiert le membre P50 de la famille de NF- $\kappa$ B. De ces recherches découle une nouvelle fonction de MT1-MMP qui est essentielle dans la signalisation de COX-2. Nos résultats suggèrent donc un axe de signalisation MT1-MMP/COX-2 dans les CSC CD133(+) qui contribuerait aux propriétés de résistance face aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie ainsi qu'au potentiel invasif de ces cellules.

Le champ de recherche sur les CSC est en pleine émergence. Sans aucun doute, les prochaines années amèneront de nouvelles connaissances dans les mécanismes moléculaires qui gouvernent le développement, l'auto-renouvellement, la survie et la différenciation des CSC. L'identification de ces CSC au sein des tumeurs a amené une meilleure compréhension de la résistance de ces tumeurs aux thérapies conventionnelles. Cette découverte propose aussi de nouvelle voie thérapeutique comme le ciblage de la niche vasculaire tumorale. De plus, en connaissant les cellules qui mènent au développement tumoral, nous serons maintenant en mesure de déterminer de nouvelles cibles moléculaires ou des voies signalétiques clés qui jouent des rôles critiques dans ces CSC qui semblent relier aux racines des cancers.

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aggarwal, B. B. (2004). «Nuclear factor-kappaB: the enemy within». *Cancer Cell* **6**(3): 203-8.
- Alfranca, A., Lopez-Oliva, J. M., Genis, L., Lopez-Maderuelo, D., Mirones, I., Salvado, D., Quesada, A. J., Arroyo, A. G. and Redondo, J. M. (2008). «PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway». *Blood* **112**(4): 1120-8.
- Amirghahari, N., Harrison, L., Smith, M., Rong, X., Naumann, I., Ampil, F., Shi, R., Glass, J. and Nathan, C. O. (2003). «NS 398 radiosensitizes an HNSCC cell line by possibly inhibiting radiation-induced expression of COX-2». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**(5): 1405-12.
- Annabi, B., Rojas-Sutterlin, S., Laflamme, C., Lachambre, M. P., Rolland, Y., Sartelet, H. and Beliveau, R. (2008). «Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype». *Mol Cancer Res* **6**(6): 907-16.
- Ansari, S. A., Safak, M., Del Valle, L., Enam, S., Amini, S. and Khalili, K. (2001). «Cell cycle regulation of NF-kappa b-binding activity in cells from human glioblastomas». *Exp Cell Res* **265**(2): 221-33.
- Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Shishodia, S., Gairola, C. G. and Aggarwal, B. B. (2002). «Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2». *Carcinogenesis* **23**(9): 1511-8.
- Ariga, A., Namekawa, J., Matsumoto, N., Inoue, J. and Umezawa, K. (2002). «Inhibition of tumor necrosis factor-alpha -induced nuclear translocation and activation of NF-kappa B by dehydroxymethylepoxyquinomicin». *J Biol Chem* **277**(27): 24625-30.
- Banerjee, S., Bueso-Ramos, C. and Aggarwal, B. B. (2002). «Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9». *Cancer Res* **62**(17): 4945-54.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D. and Rich, J. N. (2006). «Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response». *Nature* **444**(7120): 756-60.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., Shi, Q., McLendon, R. E., Bigner, D. D. and Rich, J. N. (2006). «Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor». *Cancer Res* **66**(16): 7843-8.
- Baud, V. and Karin, M. (2001). «Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives». *Trends Cell Biol* **11**(9): 372-7.
- Baykal, D., Schmedtje, J. F., Jr. and Runge, M. S. (1995). «Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis». *Am J Cardiol* **75**(6): 82B-87B.
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J. and Annabi, B. (2007). «Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision». *Neoplasia* **9**(4): 332-40.
- Bidlingmaier, S., Zhu, X. and Liu, B. (2008). «The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells». *J Mol Med* **86**(9): 1025-32.
- Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E. and Pardee, A. B. (2000). «Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle

- progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells». *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8542-7.
- Bjorklund, M. and Koivunen, E. (2005). «Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells». *Biochim Biophys Acta* **1755**(1): 37-69.
- Blazek, E. R., Foutch, J. L. and Maki, G. (2007). «Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**(1): 1-5.
- Boivin, D., Labbe, D., Fontaine, N., Lamy, S., Beaulieu, E., Gingras, D. and Beliveau, R. (2009). «The Stem Cell Marker CD133 (prominin-1) is Phosphorylated on Cytoplasmic Tyrosine-828 and Tyrosine-852 by Src and Fyn Tyrosine Kinases». *Biochemistry*.
- Bouck, N., Stellmach, V. and Hsu, S. C. (1996). «How tumors become angiogenic». *Adv Cancer Res* **69**: 135-74.
- Bramhall, S. R., Hallissey, M. T., Whiting, J., Scholefield, J., Tierney, G., Stuart, R. C., Hawkins, R. E., McCulloch, P., Maughan, T., Brown, P. D., Baillet, M. and Fielding, J. W. (2002). «Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomised trial». *Br J Cancer* **86**(12): 1864-70.
- Bramhall, S. R., Rosemurgy, A., Brown, P. D., Bowry, C. and Buckels, J. A. (2001). «Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial». *J Clin Oncol* **19**(15): 3447-55.
- Brunschwig, A. (1960). «Surgical treatment of stage 1 cancer of the cervix». *Cancer* **13**: 34-6.
- Bryan, T. M. and Cech, T. R. (1999). «Telomerase and the maintenance of chromosome ends». *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 318-24.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I. T., Zakharenko, S. S., Gajjar, A., Davidoff, A. and Gilbertson, R. J. (2007). «A perivascular niche for brain tumor stem cells». *Cancer Cell* **11**(1): 69-82.
- Castelli, M. G., Chiabrando, C., Fanelli, R., Martelli, L., Butti, G., Gaetani, P. and Paoletti, P. (1989). «Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors». *Cancer Res* **49**(6): 1505-8.
- Castellone, M. D., Teramoto, H., Williams, B. O., Druey, K. M. and Gutkind, J. S. (2005). «Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis». *Science* **310**(5753): 1504-10.
- Chambers, A. F. and Matrisian, L. M. (1997). «Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis». *J Natl Cancer Inst* **89**(17): 1260-70.
- Chen, X., Shen, B., Xia, L., Khaletskiy, A., Chu, D., Wong, J. Y. and Li, J. J. (2002). «Activation of nuclear factor kappaB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes». *Cancer Res* **62**(4): 1213-21.
- Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V. and Alitalo, K. (1997). «Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C». *J Biol Chem* **272**(40): 25176-83.
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H. and Ballard, D. W. (1997). «Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control». *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(19): 10057-62.

- Corbeil, D., Roper, K., Fargeas, C. A., Joester, A. and Huttner, W. B. (2001). «Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology». *Traffic* **2**(2): 82-91.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. (1996). «Matrix metalloproteinases and the development of cancer». *Chem Biol* **3**(11): 895-904.
- D'Alessio, S., Ferrari, G., Cinnante, K., Scheerer, W., Galloway, A. C., Roses, D. F., Rozanov, D. V., Remacle, A. G., Oh, E. S., Shiryayev, S. A., Strongin, A. Y., Pintucci, G. and Mignatti, P. (2008). «Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism». *J Biol Chem* **283**(1): 87-99.
- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G. A., Roos, B. A. and Schiller, P. C. (2006). «Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells». *Bone* **39**(3): 513-22.
- Davis, T. W., O'Neal, J. M., Pagel, M. D., Zweifel, B. S., Mehta, P. P., Heuvelman, D. M. and Masferrer, J. L. (2004). «Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature». *Cancer Res* **64**(1): 279-85.
- Demuth, T. and Berens, M. E. (2004). «Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion». *J Neurooncol* **70**(2): 217-28.
- Diabira, S. and Morandi, X. (2008). «Gliomagenesis and neural stem cells: Key role of hypoxia and concept of tumor "neo-niche"». *Med Hypotheses* **70**(1): 96-104.
- Dick, J. E. (2003). «Breast cancer stem cells revealed». *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3547-9.
- Eccles, S. A., Box, G. M., Court, W. J., Bone, E. A., Thomas, W. and Brown, P. D. (1996). «Control of lymphatic and hematogenous metastasis of a rat mammary carcinoma by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94)». *Cancer Res* **56**(12): 2815-22.
- Egawa, N., Koshikawa, N., Tomari, T., Nabeshima, K., Isobe, T. and Seiki, M. (2006). «Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) cleaves and releases a 22-kDa extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) fragment from tumor cells». *J Biol Chem* **281**(49): 37576-85.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-74.
- Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., Harper, J., Tamvakopoulos, G. and Moses, M. A. (2000). «Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model». *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 3884-9.
- Fillmore, H. L., VanMeter, T. E. and Broaddus, W. C. (2001). «Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion». *J Neurooncol* **53**(2): 187-202.
- Folkman, J. (1997). «Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview». *EXS* **79**: 1-8.
- Fortier, S., Labelle, D., Sina, A., Moreau, R. and Annabi, B. (2008). «Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells». *FEBS Lett* **582**(5): 799-804.
- Fortier, S., Touaibia, M., Lord-Dufour, S., Galipeau, J., Roy, R. and Annabi, B. (2008). «Tetra- and hexavalent mannosides inhibit the pro-apoptotic, antiproliferative and

- cell surface clustering effects of concanavalin-A: impact on MT1-MMP functions in marrow-derived mesenchymal stromal cells». *Glycobiology* **18**(2): 195-204.
- Fox, C. J., Hammerman, P. S., Cinalli, R. M., Master, S. R., Chodosh, L. A. and Thompson, C. B. (2003). «The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor». *Genes Dev* **17**(15): 1841-54.
- Fuchs, E., Tumber, T. and Guasch, G. (2004). «Socializing with the neighbors: stem cells and their niche». *Cell* **116**(6): 769-78.
- Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S. and Ohnishi, T. (2007). «Silencing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas». *Int J Oncol* **30**(4): 793-802.
- Funk, C. D. (2001). «Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology». *Science* **294**(5548): 1871-5.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. and Vescovi, A. (2004). «Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma». *Cancer Res* **64**(19): 7011-21.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N. (1999). «VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation». *Nat Med* **5**(6): 623-8.
- Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M. P., Annabi, B. and Beliveau, R. (2001). «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett* **507**(2): 231-6.
- Giordano, F. J. and Johnson, R. S. (2001). «Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch». *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 35-40.
- Golubkov, V. S., Chekanov, A. V., Savinov, A. Y., Rozanov, D. V., Golubkova, N. V. and Strongin, A. Y. (2006). «Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells». *Cancer Res* **66**(21): 10460-5.
- Gunzburg, W. H., Lohr, M. and Salmons, B. (2002). «Novel treatments and therapies in development for pancreatic cancer». *Expert Opin Investig Drugs* **11**(6): 769-86.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W. and Weinberg, R. A. (1999). «Creation of human tumour cells with defined genetic elements». *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). «The hallmarks of cancer». *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hayflick, L. (1997). «Mortality and immortality at the cellular level. A review». *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1180-90.
- Hess, K. R. (1999). «Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas». *J Neurooncol* **42**(3): 227-31.
- Hidalgo, M. and Eckhardt, S. G. (2001). «Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy». *J Natl Cancer Inst* **93**(3): 178-93.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A. E., Wulf, G. G., Nuchtern, J. G., Jax, T. W., Gobel, U., Goodell, M. A. and Brenner, M. K. (2004). «A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells». *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39): 14228-33.

- Horiguchi, Y., Kuroda, K., Nakashima, J., Murai, M. and Umezawa, K. (2003). «Antitumor effect of a novel nuclear factor-kappa B activation inhibitor in bladder cancer cells». *Expert Rev Anticancer Ther* **3**(6): 793-8.
- Hotary, K., Li, X. Y., Allen, E., Stevens, S. L. and Weiss, S. J. (2006). «A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program». *Genes Dev* **20**(19): 2673-86.
- Hsieh, H. L., Sun, C. C., Wang, T. S. and Yang, C. M. (2008). «PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells». *Biochim Biophys Acta* **1783**(9): 1563-75.
- Ichikawa, H., Nakamura, Y., Kashiwada, Y. and Aggarwal, B. B. (2007). «Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets». *Curr Pharm Des* **13**(33): 3400-16.
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D. and Steindler, D. A. (2002). «Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro». *Glia* **39**(3): 193-206.
- Itoh, Y. (2006). «MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue». *IUBMB Life* **58**(10): 589-96.
- Jensen, R. L., Ragel, B. T., Whang, K. and Gillespie, D. (2006). «Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas». *J Neurooncol* **78**(3): 233-47.
- Jeong, K. J., Park, S. Y., Seo, J. H., Lee, K. B., Choi, W. S., Han, J. W., Kang, J. K., Park, C. G., Kim, Y. K. and Lee, H. Y. (2008). «Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAOV-3 ovarian cancer cells». *Exp Mol Med* **40**(6): 607-16.
- Jiang, A., Lehti, K., Wang, X., Weiss, S. J., Keski-Oja, J. and Pei, D. (2001). «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(24): 13693-8.
- Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A. C. and Paraskeva, C. (2006). «Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia». *Cancer Res* **66**(13): 6683-91.
- Kaltschmidt, B., Widera, D. and Kaltschmidt, C. (2005). «Signaling via NF-kappaB in the nervous system». *Biochim Biophys Acta* **1745**(3): 287-99.
- Kang, K. B., Wang, T. T., Woon, C. T., Cheah, E. S., Moore, X. L., Zhu, C. and Wong, M. C. (2007). «Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**(3): 888-96.
- Karmakar, S., Banik, N. L. and Ray, S. K. (2007). «Molecular mechanism of inositol hexaphosphate-mediated apoptosis in human malignant glioblastoma T98G cells». *Neurochem Res* **32**(12): 2094-102.
- Kikuchi, E., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Kuroda, K., Oya, M., Ohigashi, T., Takahashi, N., Shima, Y., Umezawa, K. and Murai, M. (2003). «Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor kappaB inhibitor in nude mice». *Cancer Res* **63**(1): 107-10.



- Kim, D. W., Gazourian, L., Quadri, S. A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D. H. and Sonenshein, G. E. (2000). «The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells». *Oncogene* **19**(48): 5498-506.
- Kim, S. J., Jeong, H. J., Lee, K. M., Myung, N. Y., An, N. H., Yang, W. M., Park, S. K., Lee, H. J., Hong, S. H., Kim, H. M. and Um, J. Y. (2007). «Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells». *J Nutr Biochem* **18**(9): 587-96.
- Kim, S. J., Kang, S. Y., Shin, H. H. and Choi, H. S. (2005). «Sulforaphane inhibits osteoclastogenesis by inhibiting nuclear factor-kappaB». *Mol Cells* **20**(3): 364-70.
- Kishi, K., Petersen, S., Petersen, C., Hunter, N., Mason, K., Masferrer, J. L., Tofilon, P. J. and Milas, L. (2000). «Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor». *Cancer Res* **60**(5): 1326-31.
- Kleihues, P. and Sobin, L. H. (2000). «World Health Organization classification of tumors». *Cancer* **88**(12): 2887.
- Kondo, S., Kubota, S., Shimo, T., Nishida, T., Yosimichi, G., Eguchi, T., Sugahara, T. and Takigawa, M. (2002). «Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases». *Carcinogenesis* **23**(5): 769-76.
- Koong, A. C., Chen, E. Y., Mivechi, N. F., Denko, N. C., Stambrook, P. and Giaccia, A. J. (1994). «Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2)». *Cancer Res* **54**(20): 5273-9.
- Kordes, U., Krappmann, D., Heissmeyer, V., Ludwig, W. D. and Scheidereit, C. (2000). «Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells». *Leukemia* **14**(3): 399-402.
- Korkolopoulou, P., Levidou, G., Saetta, A. A., El-Habr, E., Eftichiadis, C., Demenagas, P., Thymara, I., Xiromeritis, K., Boviatsis, E., Thomas-Tsagli, E., Panayotidis, I. and Patsouris, E. (2008). «Expression of nuclear factor-kappaB in human astrocytomas: relation to p1 kappa Ba, vascular endothelial growth factor, Cox-2, microvascular characteristics, and survival». *Hum Pathol* **39**(8): 1143-52.
- Krakauer, T. (2008). «Nuclear factor-kappaB: fine-tuning a central integrator of diverse biologic stimuli». *Int Rev Immunol* **27**(5): 286-92.
- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. and Wajant, H. (2001). «NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling». *Mol Cell Biol* **21**(12): 3964-73.
- Kuge, Y., Takai, N., Ishino, S., Temma, T., Shiomi, M. and Saji, H. (2007). «Distribution profiles of membrane Type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in rabbit atherosclerosis: comparison with plaque instability analysis». *Biol Pharm Bull* **30**(9): 1634-40.
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. and Aggarwal, B. B. (2004). «Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease». *J Mol Med* **82**(7): 434-48.
- Lampert, K., Machein, U., Machein, M. R., Conca, W., Peter, H. H. and Volk, B. (1998). «Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors». *Am J Pathol* **153**(2): 429-37.

- Lanza-Jacoby, S., Dicker, A. P., Miller, S., Rosato, F. E., Flynn, J. T., Lavorgna, S. N. and Burd, R. (2004). «Cyclooxygenase (COX)-2-dependent effects of the inhibitor SC236 when combined with ionizing radiation in mammary tumor cells derived from HER-2/neu mice». *Mol Cancer Ther* **3**(4): 417-24.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L. and Yu, J. S. (2006). «Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma». *Mol Cancer* **5**: 67.
- Liu, W., Chen, Y., Wang, W., Keng, P., Finkelstein, J., Hu, D., Liang, L., Guo, M., Fenton, B., Okunieff, P. and Ding, I. (2003). «Combination of radiation and celebrex (celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth». *Am J Clin Oncol* **26**(4): S103-9.
- Loch, T., Michalski, B., Mazurek, U. and Graniczka, M. (2001). «[Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in neoplastic processes]». *Postepy Hig Med Dosw* **55**(2): 257-74.
- Macaulay, V. M., O'Byrne, K. J., Saunders, M. P., Braybrooke, J. P., Long, L., Gleeson, F., Mason, C. S., Harris, A. L., Brown, P. and Talbot, D. C. (1999). «Phase I study of intrapleural batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in the treatment of malignant pleural effusions». *Clin Cancer Res* **5**(3): 513-20.
- Mayo, M. W. and Baldwin, A. S. (2000). «The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance». *Biochim Biophys Acta* **1470**(2): M55-62.
- Mayo, M. W., Norris, J. L. and Baldwin, A. S. (2001). «Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis». *Methods Enzymol* **333**: 73-87.
- Moore, M. J., Hamm, J., Dancey, J., Eisenberg, P. D., Dagenais, M., Fields, A., Hagan, K., Greenberg, B., Colwell, B., Zee, B., Tu, D., Ottaway, J., Humphrey, R. and Seymour, L. (2003). «Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group». *J Clin Oncol* **21**(17): 3296-302.
- Moses, H. L., Yang, E. Y. and Pietenpol, J. A. (1990). «TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights». *Cell* **63**(2): 245-7.
- Naglich, J. G., Jure-Kunkel, M., Gupta, E., Fagnoli, J., Henderson, A. J., Lewin, A. C., Talbott, R., Baxter, A., Bird, J., Savopoulos, R., Wills, R., Kramer, R. A. and Trail, P. A. (2001). «Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291». *Cancer Res* **61**(23): 8480-5.
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N. L., Hoelzinger, D. B. and Berens, M. E. (2007). «Molecular targets of glioma invasion». *Cell Mol Life Sci* **64**(4): 458-78.
- Nakamura, H., Suenaga, N., Taniwaki, K., Matsuki, H., Yonezawa, K., Fujii, M., Okada, Y. and Seiki, M. (2004). «Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *Cancer Res* **64**(3): 876-82.
- Nakano, A., Tani, E., Miyazaki, K., Yamamoto, Y. and Furuyama, J. (1995). «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas». *J Neurosurg* **83**(2): 298-307.
- Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr. and Sledge, G. W., Jr. (1997). «Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth». *Mol Cell Biol* **17**(7): 3629-39.

- Nyalendo, C., Michaud, M., Beaulieu, E., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. and Beliveau, R. (2007). «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem* **282**(21): 15690-9.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lutolf, U. M. and Kleihues, P. (2004). «Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study». *Cancer Res* **64**(19): 6892-9.
- Osenkowski, P., Toth, M. and Fridman, R. (2004). «Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Cell Physiol* **200**(1): 2-10.
- Overall, C. M. and Kleinfeld, O. (2006). «Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy». *Nat Rev Cancer* **6**(3): 227-39.
- Ozen, O., Krebs, B., Hemmerlein, B., Pekrun, A., Kretschmar, H. and Herms, J. (2004). «Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in medulloblastomas and their prognostic relevance». *Clin Cancer Res* **10**(14): 4746-53.
- Pahl, H. L. (1999). «Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors». *Oncogene* **18**(49): 6853-66.
- Palayoor, S. T., Youmell, M. Y., Calderwood, S. K., Coleman, C. N. and Price, B. D. (1999). «Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen». *Oncogene* **18**(51): 7389-94.
- Paoletti, P., Chiabrando, C., Gaetani, P., Castelli, M. G., Butti, G., Martelli, L. and Rolli, M. (1989). «Prostaglandins in human brain tumors». *J Neurosurg Sci* **33**(1): 65-9.
- Petersen, C., Petersen, S., Milas, L., Lang, F. F. and Tofilon, P. J. (2000). «Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor». *Clin Cancer Res* **6**(6): 2513-20.
- Poligone, B. and Baldwin, A. S. (2001). «Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins». *J Biol Chem* **276**(42): 38658-64.
- Pozzi, A., Yan, X., Macias-Perez, I., Wei, S., Hata, A. N., Breyer, R. M., Morrow, J. D. and Capdevila, J. H. (2004). «Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation». *J Biol Chem* **279**(28): 29797-804.
- Pyo, H., Choy, H., Amorino, G. P., Kim, J. S., Cao, Q., Hercules, S. K. and DuBois, R. N. (2001). «A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, enhances the effect of radiation in vitro and in vivo preferentially on the cells that express cyclooxygenase-2». *Clin Cancer Res* **7**(10): 2998-3005.
- Radhakrishnan, K., Mokri, B., Parisi, J. E., O'Fallon, W. M., Sunku, J. and Kurland, L. T. (1995). «The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota». *Ann Neurol* **37**(1): 67-73.
- Raju, U., Nakata, E., Yang, P., Newman, R. A., Ang, K. K. and Milas, L. (2002). «In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**(3): 886-94.
- Rao, J. S. (2003). «Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases». *Nat Rev Cancer* **3**(7): 489-501.

- Raychaudhuri, B., Han, Y., Lu, T. and Vogelbaum, M. A. (2007). «Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype». *J Neurooncol* **85**(1): 39-47.
- Remacle, A. G., Chekanov, A. V., Golubkov, V. S., Savinov, A. Y., Rozanov, D. V. and Strongin, A. Y. (2006). «O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Biol Chem* **281**(25): 16897-905.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). «Stem cells, cancer, and cancer stem cells». *Nature* **414**(6859): 105-11.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S. (1992). «Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system». *Science* **255**(5052): 1707-10.
- Robe, P. A., Bentires-Alj, M., Bonif, M., Rogister, B., Deprez, M., Haddada, H., Khac, M. T., Jolois, O., Erkmen, K., Merville, M. P., Black, P. M. and Bours, V. (2004). «In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas». *Clin Cancer Res* **10**(16): 5595-603.
- Roper, K., Corbeil, D. and Huttner, W. B. (2000). «Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane». *Nat Cell Biol* **2**(9): 582-92.
- Rozanov, D. V., Ghebrehiwet, B., Postnova, T. I., Eichinger, A., Deryugina, E. I. and Strongin, A. Y. (2002). «The hemopexin-like C-terminal domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates proteolysis of a multifunctional protein, gC1qR». *J Biol Chem* **277**(11): 9318-25.
- Russell, J. S., Raju, U., Gumin, G. J., Lang, F. F., Wilson, D. R., Huet, T. and Tofilon, P. J. (2002). «Inhibition of radiation-induced nuclear factor-kappaB activation by an anti-Ras single-chain antibody fragment: lack of involvement in radiosensitization». *Cancer Res* **62**(8): 2318-26.
- Sarnico, I., Lanzillotta, A., Boroni, F., Benarese, M., Alghisi, M., Schwaninger, M., Inta, I., Battistin, L., Spano, P. and Pizzi, M. (2009). «NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia». *J Neurochem* **108**(2): 475-85.
- Sawaya, R. E., Yamamoto, M., Gokaslan, Z. L., Wang, S. W., Mohanam, S., Fuller, G. N., McCutcheon, I. E., Stetler-Stevenson, W. G., Nicolson, G. L. and Rao, J. S. (1996). «Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo». *Clin Exp Metastasis* **14**(1): 35-42.
- Scott, C. B., Scarantino, C., Urtasun, R., Movsas, B., Jones, C. U., Simpson, J. R., Fischbach, A. J. and Curran, W. J., Jr. (1998). «Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**(1): 51-5.
- Semenza, G. L. and Wang, G. L. (1992). «A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation». *Mol Cell Biol* **12**(12): 5447-54.
- Shay, J. W. and Bacchetti, S. (1997). «A survey of telomerase activity in human cancer». *Eur J Cancer* **33**(5): 787-91.
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D. and DuBois, R. N. (1998). «Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells». *Cancer Res* **58**(2): 362-6.

- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S. and Aggarwal, B. B. (2003). «Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1». *Cancer Res* **63**(15): 4375-83.
- Shono, T., Tofilon, P. J., Bruner, J. M., Owolabi, O. and Lang, F. F. (2001). «Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations». *Cancer Res* **61**(11): 4375-81.
- Simpson, J. R., Horton, J., Scott, C., Curran, W. J., Rubin, P., Fischbach, J., Isaacson, S., Rotman, M., Asbell, S. O., Nelson, J. S. and et al. (1993). «Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**(2): 239-44.
- Singh, R. K., Gutman, M., Bucana, C. D., Sanchez, R., Llansa, N. and Fidler, I. J. (1995). «Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas». *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4562-6.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P. B. (2003). «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors». *Cancer Res* **63**(18): 5821-8.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. and Dirks, P. B. (2004). «Identification of human brain tumour initiating cells». *Nature* **432**(7015): 396-401.
- Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000). «Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology». *Annu Rev Biochem* **69**: 145-82.
- Société-canadienne-du-cancer (2008). Statistiques canadiennes sur le cancer: Le cancer au Canada, les faits en bref.
- Sparano, J. A., Bernardo, P., Stephenson, P., Gradishar, W. J., Ingle, J. N., Zucker, S. and Davidson, N. E. (2004). «Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196». *J Clin Oncol* **22**(23): 4683-90.
- Sporn, M. B. (1996). «The war on cancer». *Lancet* **347**(9012): 1377-81.
- Starenki, D., Namba, H., Saenko, V., Ohtsuru, A. and Yamashita, S. (2004). «Inhibition of nuclear factor-kappaB cascade potentiates the effect of a combination treatment of anaplastic thyroid cancer cells». *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1): 410-8.
- Statistics-Canada (2008). Canadian Cancer Statistique, Canadian Cancer Society, National Cancer Institute of Canada, Public Health Agency of Canada.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B. and Bode, W. (1995). «The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases». *Protein Sci* **4**(5): 823-40.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L. and Cory, S. (1990). «Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2». *Nature* **348**(6299): 331-3.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.

- C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E. and Mirimanoff, R. O. (2005). «Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma». *N Engl J Med* **352**(10): 987-96.
- Syeda, F., Grosjean, J., Houliston, R. A., Keogh, R. J., Carter, T. D., Paleolog, E. and Wheeler-Jones, C. P. (2006). «Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways». *J Biol Chem* **281**(17): 11792-804.
- Taphoorn, M. J., Stupp, R., Coens, C., Osoba, D., Kortmann, R., van den Bent, M. J., Mason, W., Mirimanoff, R. O., Baumert, B. G., Eisenhauer, E., Forsyth, P. and Bottomley, A. (2005). «Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial». *Lancet Oncol* **6**(12): 937-44.
- Tessner, T. G., Muhale, F., Riehl, T. E., Anant, S. and Stenson, W. F. (2004). «Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation». *J Clin Invest* **114**(11): 1676-85.
- Toualbi-Abed, K., Daniel, F., Guller, M. C., Legrand, A., Mauriz, J. L., Mauviel, A. and Bernuau, D. (2008). «Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1». *Carcinogenesis* **29**(3): 536-43.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. and Margioris, A. N. (2006). «Signalling networks regulating cyclooxygenase-2». *Int J Biochem Cell Biol* **38**(10): 1654-61.
- Tuettenberg, J., Grobholz, R., Korn, T., Wenz, F., Erber, R. and Vajkoczy, P. (2005). «Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme». *J Cancer Res Clin Oncol* **131**(1): 31-40.
- Vane, J. R. (1971). «Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs». *Nat New Biol* **231**(25): 232-5.
- Vardar-Sengul, S., Buduneli, E., Turkoglu, O., Buduneli, N., Atilla, G., Wahlgren, J., Sorsa, T. and Baylas, H. (2008). «The effects of selective COX-2 inhibitor/celecoxib and omega-3 fatty acid on matrix metalloproteinases, TIMP-1, and laminin-5gamma2-chain immunolocalization in experimental periodontitis». *J Periodontol* **79**(10): 1934-41.
- Vaupel, P., Mayer, A. and Hockel, M. (2004). «Tumor hypoxia and malignant progression». *Methods Enzymol* **381**: 335-54.
- Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). «Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells». *Nature* **335**(6189): 440-2.
- Vescovi, A. L., Galli, R. and Reynolds, B. A. (2006). «Brain tumour stem cells». *Nat Rev Cancer* **6**(6): 425-36.
- Volpert, O. V., Dameron, K. M. and Bouck, N. (1997). «Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity». *Oncogene* **14**(12): 1495-502.
- Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., Shapiro, S. D., Senior, R. M. and Werb, Z. (1998). «MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes». *Cell* **93**(3): 411-22.

- Walker, M. D., Alexander, E., Jr., Hunt, W. E., MacCarty, C. S., Mahaley, M. S., Jr., Mealey, J., Jr., Norrell, H. A., Owens, G., Ransohoff, J., Wilson, C. B., Gehan, E. A. and Strike, T. A. (1978). «Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial». *J Neurosurg* **49**(3): 333-43.
- Wang, C. Y., Cusack, J. C., Jr., Liu, R. and Baldwin, A. S., Jr. (1999). «Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB». *Nat Med* **5**(4): 412-7.
- Ward, R. J. and Dirks, P. B. (2007). «Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development». *Annu Rev Pathol* **2**: 175-89.
- Weaver, K. D., Yeyeodu, S., Cusack, J. C., Jr., Baldwin, A. S., Jr. and Ewend, M. G. (2003). «Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor kappa B in human gliomas». *J Neurooncol* **61**(3): 187-96.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. and Huttner, W. B. (1997). «Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells». *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12425-30.
- Weinberg, R. A. (1995). «The retinoblastoma protein and cell cycle control». *Cell* **81**(3): 323-30.
- Widera, D., Mikenberg, I., Kaltschmidt, B. and Kaltschmidt, C. (2006). «Potential role of NF-kappaB in adult neural stem cells: the underrated steersman?». *Int J Dev Neurosci* **24**(2-3): 91-102.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimmer, A., Dichgans, J. and Wick, W. (2001). «Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma». *Cancer Res* **61**(6): 2744-50.
- Wylie, S., MacDonald, I. C., Varghese, H. J., Schmidt, E. E., Morris, V. L., Groom, A. C. and Chambers, A. F. (1999). «The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells». *Clin Exp Metastasis* **17**(2): 111-7.
- Xie, W. L., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. and Simmons, D. L. (1991). «Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing». *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(7): 2692-6.
- Yamamoto, M., Mohanam, S., Sawaya, R., Fuller, G. N., Seiki, M., Sato, H., Gokaslan, Z. L., Liotta, L. A., Nicolson, G. L. and Rao, J. S. (1996). «Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro». *Cancer Res* **56**(2): 384-92.
- Yang, C. C., Lin, H. P., Chen, C. S., Yang, Y. T., Tseng, P. H. and Rangnekar, V. M. (2003). «Bcl-xL mediates a survival mechanism independent of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer cells». *J Biol Chem* **278**(28): 25872-8.
- Yang, Z. J. and Wechsler-Reya, R. J. (2007). «Hit 'em where they live: targeting the cancer stem cell niche». *Cancer Cell* **11**(1): 3-5.
- Yokoyama, C., Takai, T. and Tanabe, T. (1988). «Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence». *FEBS Lett* **231**(2): 347-51.
- Zacchigna, S., Oh, H., Wilsch-Brauninger, M., Missol-Kolka, E., Jaszai, J., Jansen, S., Tanimoto, N., Tonagel, F., Seeliger, M., Huttner, W. B., Corbeil, D., Dewerchin, M., Vinckier, S., Moons, L. and Carmeliet, P. (2009). «Loss of the cholesterol-binding

protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration». *J Neurosci* **29**(7): 2297-308.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. and Herold-Mende, C. C. (2008). «Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients». *Clin Cancer Res* **14**(1): 123-9.